



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

|   |  |  |
|---|--|--|
| <p>(51) 国際特許分類6<br/>C12N 9/12, 15/51, 1/21 // (C12N 9/12, C12R 1:19) (C12N 15/51, C12R 1:01) (C12N 1/21, C12R 1:19)</p>   | <p>A1</p>  | <p>(11) 国際公開番号 WO99/43792</p> <p>(43) 国際公開日 1999年9月2日 (02.09.99)</p> |
| <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/04204</p> <p>(22) 国際出願日 1998年9月18日 (18.09.98)</p> <p>(30) 優先権データ<br/>特願平10/47015 1998年2月27日 (27.02.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)<br/>イーライ・リリー・アンド・カンパニー<br/>(ELI LILLY AND COMPANY)[US/US]<br/>46285 インディアナ州 インディアナポリス市、<br/>リリー・コーポレート・センター Indiana, (US)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)<br/>村上清史(MURAKAMI, Seishi)[JP/JP]<br/>〒920-0946 石川県金沢市大桑町和12-13 Ishikawa, (JP)<br/>山下竜也(YAMASHITA, Tatsuya)[JP/JP]<br/>〒920-1165 石川県金沢市若松町77街区3番地102 Ishikawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人<br/>弁理士 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.)<br/>〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号<br/>IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)</p>   | <p>(81) 指定国 CA, JP, US</p> <p>添付公開書類<br/>国際調査報告書</p> |  |
| <p>(54) Title: RECOMBINANT PROTEIN HAVING RNA-DEPENDENT POLYMERASE ACTIVITY OF HUMAN HEPATITIS C VIRUS AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME</p> <p>(54) 発明の名称 ヒトC型肝炎ウイルスのRNA依存性ポリメラーゼ活性を有する組換え型タンパク及びその製造方法</p> <p>(57) Abstract<br/>A process for producing a recombinant RNA-dependent RNA polymerase which comprises transforming host cells by an expression vector containing a DNA originating in an RNA-dependent RNA polymerase of a human hepatitis C virus and encoding a soluble polypeptide having a polymerase activity and another DNA encoding a second polypeptide other than the above-mentioned one, culturing the resultant transformant, and taking up from the medium a fused protein having the polymerase activity, optionally followed by the separation and recovery of the polypeptide having the polymerase activity from the fused protein; and the recombinant RNA-dependent RNA polymerase thus obtained.</p> |  |  |

(57)要約

ヒトC型肝炎ウイルスのRNA依存性RNAポリメラーゼ由来の、ポリメラーゼ活性を有する可溶性ポリペプチドをコードするDNAと、該ポリペプチド以外の第2のポリペプチドをコードするDNAとを含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、培地から該ポリメラーゼ活性を有する融合タンパクを回収し、所望により、該融合タンパクからポリメラーゼ活性を有するポリペプチドを分離、回収することからなる、組換え型RNA依存性RNAポリメラーゼの製造方法及びそのようにして得られた組換え型RNA依存性RNAポリメラーゼ。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

|    |              |    |         |    |                |    |            |
|----|--------------|----|---------|----|----------------|----|------------|
| AE | アラブ首長国連邦     | DM | ドミニカ    | KZ | カザフスタン         | SD | スーダン       |
| AL | アルバニア        | EE | エストニア   | LC | セントルシア         | SE | スウェーデン     |
| AM | アルメニア        | ES | スペイン    | LI | リヒテンシュタイン      | SG | シンガポール     |
| AT | オーストリア       | FI | フィンランド  | LK | スリランカ          | SI | スロヴェニア     |
| AU | オーストラリア      | FR | フランス    | LR | ラベリア           | SK | スロヴァキア     |
| AZ | アゼルバイジャン     | GA | ガボン     | LS | レソト            | SL | シエラ・レオネ    |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GB | 英国      | LT | リトアニア          | SN | セネガル       |
| BB | バルバドス        | GD | グレナダ    | LV | ラトヴィア          | SZ | スワジランド     |
| BE | ベルギー         | GE | グルジア    | MC | モナコ            | TD | チャド        |
| BF | ブルキナ・ファソ     | GM | ガンビア    | MD | モルドヴァ          | TG | トーゴ        |
| BG | ブルガリア        | GN | ギニア     | MG | マダガスカル         | TJ | タジキスタン     |
| BJ | ベナン          | GW | ギニア・ビサウ | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア | TZ | タンザニア      |
| BR | ブラジル         | GR | ギリシャ    | ML | マリ             | TM | トルクメニスタン   |
| BY | ベラルーシ        | HR | クロアチア   | MN | モンゴル           | TR | トルコ        |
| CA | カナダ          | HU | ハンガリー   | MR | モーリタニア         | TT | トリニダード・トバゴ |
| CF | 中央アフリカ       | ID | インドネシア  | MW | マラウイ           | UA | ウクライナ      |
| CG | コンゴ          | IE | アイルランド  | MX | メキシコ           | UG | ウガンダ       |
| CH | スイス          | IL | イスラエル   | NE | ニジェール          | US | 米国         |
| CI | コートジボアール     | IN | インド     | NL | オランダ           | UZ | ウズベキスタン    |
| CM | カメルーン        | IS | アイスランド  | NO | ノールウェー         | VN | ヴェトナム      |
| CN | 中国           | IT | イタリア    | NZ | ニュージーランド       | YU | ユーゴスラビア    |
| CR | コスタ・リカ       | JP | 日本      | PL | ポーランド          | ZA | 南アフリカ共和国   |
| CU | キューバ         | KE | ケニア     | PT | ポルトガル          | ZW | ジンバブエ      |
| CY | キプロス         | KG | キルギスタン  | RO | ルーマニア          |    |            |
| CZ | チェコ          | KP | 北朝鮮     | RU | ロシア            |    |            |
| DE | ドイツ          | KR | 韓国      |    |                |    |            |
| DK | デンマーク        |    |         |    |                |    |            |

## 明 細 書

ヒトC型肝炎ウイルスのRNA依存性ポリメラーゼ活性を有する組換え型タンパク及びその製造方法

5

## 技術分野

本発明は、C型肝炎ウイルスのRNA依存性RNAポリメラーゼ活性を有する、可溶性の組換え型タンパクに関する。

10

## 背景技術

C型肝炎ウイルス (HCV) は、非A非B肝炎の原因ウイルスとして、1989年にカイロン社 (Chiron) のグループが単離同定した+鎖RNAウイルスである。疫学的調査で、世界的に、HCV感染人口は約1%と推定されている。感染経路は輸血等の血液を介するもの以外に重要な経路は未定であり、親子間の垂直感染の寄与は低いと推定されている。Chiron社が開発したHCVの免疫診断により、輸血による感染の予防は画期的な成果を上げている。

15

HCVはRNAウイルスでありながら、長期の持続性感染を肝臓に引き起こし、慢性肝炎の原因になる。約30年以上のHCV慢性肝炎は、引き続く肝細胞がん (肝がん) の主要な原因となっており、日本では全肝がんの少なくとも75%以上がHCV肝炎を背景として発症している。

20

HCV関連肝がんは病態の経過から、発症のリスクが予測できるといわれるほど、一連の経過を経て発がんが見られる。従って、HCVウイルスの増殖をブロックすることは、HCVによる肝炎を軽減し、肝がん発症の予防に有効であることが期待される。

25

現在、HCVの感染とHCV増殖阻止を目指して種々の方途が検討されているが、未だ決定的な方法は確立されていない。

まず、ウイルス感染の阻止を目標とした、HCV表面タンパクを標的とする免疫的研究は、ウイルスの表面タンパクが感染途上で次々と変異を起こす能力を有

するために、所期の効果が上がっておらず、また、HCV感染に必要な宿主側のレセプターの同定も成功していない状況である。

さらに、ウイルスタンパクは一本の長いポリペプチドとして合成され（図1参照）、合成途上で宿主及びHCVの遺伝子がコードするタンパク分解酵素により切断され、ウイルスの構造及び非構造タンパクが産生される。そのタンパク分解酵素のうち、HCV NS2及びNS3がコードするタンパクによるタンパクの切断過程を阻害することを目指したNS2及びNS3に関する研究がなされ、タンパクの構造解析、阻害剤の開発が進んでいる状況であるが、未だ臨床応用には程遠い。

HCV増殖過程の研究及びワクチン開発が遅れていた大きい原因は、培養細胞を用いたHCVの感染・増殖系が存在しないことにあるが、近年、チンパンジーを用いた系で感染性のHCV RNAのクローンが同定されたことから、培養細胞のHCV増殖系が確立されれば、弱毒化ウイルスの産生とワクチンの開発、HCV増殖過程の分子機構の解明と増殖阻害剤の開発が急速に進展するものと期待されている。このように、HCV増殖・複製系の開発は、HCV複製過程とその分子機構の解明、ひいてはその増殖の特異性に基づく増殖阻害剤の設計を可能にするものと考えられる。しかしながら、現在、その研究は、その甚大で急を要する需要に直に応えることができない状況にある。

#### 発明の開示

上記の従来のアプローチとは別に、HCV複製の中心的酵素であるNS5B（図1参照）のRNA依存RNAポリメラーゼ（以下、RdRPという）活性を阻害することによりHCV感染の治療及び予防に役立てることが可能と考えられる。即ち、HCVはRNAウイルスであるが、RNAよりRNAを合成する核酸（遺伝情報）合成過程は宿主には存在しない。従って、RdRPによるHCVの複製過程を特異的に阻害する物質の開発が進められている。しかるに、そのような物質を得るためには、RdRPの機能を研究し、さらには阻害物質を検定するために、多量の精製されたNS5Bタンパクが必要である。その目的には、遺伝子組換え技術によって、適当な宿主にRdRP活性を有する組換え型NS5Bタ

ンパクを生産させる方法が最適であるが、従来、十分量の精製されたNS 5 Bを得ることはできなかった。

例えば、De Francescoらは、昆虫細胞で組換え型NS 5 Bを得、生化学的にR d R P活性を証明したが、阻害剤を検定、開発するのに十分な量の酵素を得ることは成功していない (De Francesco, R., et al., Methods Enzymol. 275:58-67, 1996)。また、多くの研究者が大腸菌系で、R d R P活性を有する組換え型NS 5 Bの発現と大量精製を試みたが、不溶性の標品しか得られず、それを変性し、再生しなければならず、十分量の、生化学的活性を保持するNS 5 Bタンパクを得ることができなかった (Tan, B.E., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997)。

本発明者らは、ヒトC型肝炎ウイルスのRNA依存性RNAポリメラーゼ (以下、単にR d R Pと称する) 活性を有するNS 5 BタンパクのC末端領域にはアンカー領域が存在することを見出し、その役割について検討を加えた結果、C末端領域から一定数のアミノ酸を欠失させ、かつ活性を維持している可溶性タンパク (NS 5 B t) と他のポリペプチドとの融合タンパクとして宿主 (例えば大腸菌) に発現させると、R d R P活性を有する可溶性の組換え型NS 5 B tタンパクが得られることを見出し、本発明を完成するに至った。即ち、NS 5 Bは、アンカー領域の存在によりタンパク精製過程において不溶性分画となるが、アンカー領域を欠失させたNS 5 B t 変異体は、R d R P活性を維持しつつ、可溶性分画に存在するために、形質転換体から、そのR d R P活性を損なうことなく回収、精製可能となった (試験例2、図10参照)。

即ち、本発明は、ヒトC型肝炎ウイルスのRNA依存性RNAポリメラーゼ由来の、ポリメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAと、該ポリペプチド以外の第2のポリペプチド (例、グルタチオンSトランスフェラーゼ: 以下、GSTという) をコードするDNAとを含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、培地からポリメラーゼ活性を有する融合タンパクを回収し、所望により、該融合タンパクからポリメラーゼ活性を有するポリペプチドを分離、回収することからなる、組換え型RNA依存性RNAポリ

メラゼの製造方法、及びそのようにして製造された可溶型の組換え型RdRP活性を有する融合又は非融合タンパクを提供するものである。

後述の実施例から明らかなように、本発明方法により、RdRP活性を有する可溶化型の精製組換え型NS5Bタンパクを大量に提供することが、初めて可能となった。

本発明に使用するヒトC型肝炎ウイルスのRdRP由来の可溶型ポリペプチドは、通常、RdRPのアンカー領域の全部又は一部を含むC末端領域を欠失されたものである。

HCVゲノムにおいてヒトC型肝炎ウイルスのNS5BはRdRP活性を有することから、本明細書では、「NS5B」なる語句と、ヒトC型肝炎ウイルスの「RdRP」と相互変換可能に用いる。そして、NS5Bから導かれる、C末端側のアミノ酸が欠失されたRdRP活性を有する可溶型のポリペプチド（タンパク）を、NS5Btと表す。なお、「NS5B」及び「NS5Bt」なる語句は、NS5B及びNS5BtタンパクをコードするDNAを表すこともある。

#### 図面の簡単な説明

図1はHCVのポリタンパク前駆体及びそのNS5Bタンパクの構造を示す模式図である。上段は、HCVのポリタンパク前駆体の構造を示す模式図、中段はNS5Bタンパクの疎水性プロフィル (Kyte and Doolittle) である。SOSUIプログラムで推定されたアンカー領域には陰影が付されている。下段は、様々なGST-NS5B融合タンパクの発現構築物の構造を示す模式図である。図中のアミノ酸番号は、HCVポリタンパク前駆体上のアミノ酸番号に対応する。NS5BはNS5Bの全アミノ酸を有し、NS5Btは、2989-3010の21アミノ酸が欠失されており、NS5Bt-m1は、GDDモチーフがVDDで置換されており、NS5Bt-m2及びNS5Bt-m3は、塩基性残基のクラスターのアラニンによる置換を有し、NS5B-m4は推定のアンカー領域内に突然変異を有する。

図2はGST融合蛋白発現プラスミド、pGENKSの制限地図である。プラ

スミドpGENKSはプロテイナーゼAのコンセンサス配列、トロンピン開裂認識部位及びマルチクローニングサイト (EcoRI、SacI、KpnI、XmaI、SalI、BamHI) をコードしており、この上流にGSTをコードするDNA配列がある。

5 図3はプラスミドpGENKSの構築の模式図である。GST-NS5B融合タンパクのトロンピンによる切断箇所は下線で示されている。図3に示すDNAのヌクレオチド配列及びそれがコードするアミノ酸配列を配列番号3に示す。

10 図4は大腸菌で発現されたGST-NS5Bの精製の各過程を示す図であり、Aは培養物から得たSDS-10%PAGEにより分離し、Coomassie 染色法 (CBB) で染色した結果の模写図である。レーン1は全細胞抽出液；レーン2は超音波処理物の遠心上清；レーン3はDEAE Sephacelに通した後の無細胞抽出液；レーン4はグルタチオンセファロース4Bカラムからの溶出液；レーン5はpoly (U) Sepharoseカラムからの溶出液；レーン6はトロンピン処理後の非融合型rNS5Bを表す。Bは抗NS5B抗体を用いるウエスタンブロッティング、Cは抗GST抗体を用いるウエスタンブロッティングの結果の模写図である。

15 図5は図4Aのレーン5、95Kdaのバンドに相当する精製されたGST-NS5BタンパクをHCV1b型感染慢性肝炎患者血清及び健常人血清を用いたウエスタンブロッティングで分析した結果の模写図である。図5において、レーン1は精製されたGST-NS5B、レーン2は対照のGSTタンパクのみを示す。矢印は95kDaの位置を指している。

20 図6はUMP取り込みアッセイにおける精製GST-NS5BのRdRP活性を示すグラフである。Aは、poly (A) 又はpoly (dA) をテンプレートとし、oligo (U) 14又はoligo (dT) をプライマーとして用い、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UMP 又は $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dTTPに対する基質特異性を調べた結果を示すグラフであり、Bは25℃及び37℃での反応のタイムコースを示し、CはGST-NS5Bの量との関係を示すグラフである。

図7は様々な反応条件下での精製GST-NS5BのUMP取り込みに基づ

く RdRP 活性を示すグラフである。図中、A は pH、B は温度、C は KCl 濃度と UMP 取り込みとの関係を示す。

図 8 は様々な反応条件下での精製 GST-NS5B の UMP 取り込みに基づく RdRP 活性を示すグラフである。図中、D は  $Mg^{2+}$  イオン、E は  $Zn^{2+}$  濃度 (0、10、25 及び  $50 \mu M$ ) と UMP 取り込みとの関係を示す。

図 9 は試験管内で転写した RNA を用いる RNA 合成アッセイの結果を示す図である。A は RNA テンプレートの構築模式図、B は試験管内で転写した RNA をテンプレート及びプライマーとして用いて  $30^{\circ}C$  で 2 時間反応させ、RNA 生成物を有機溶媒で抽出した後、エタノール沈殿し、8M 尿素含有 8% PAGE で分離、精製し、得られた泳動パターンの模写図である。

図 10 は哺乳動物細胞で発現させた NS5B の局在化を示す顕微鏡写真の模写図である。(A) は全長 NS5B、(B) は GFP-NS5B、(C) は GFP-NS5B-m4、(D) は GFP 単独を、コードする発現プラスミドでトランスフェクションされた HLE における発現産物の局在化を蛍光顕微鏡下で観察した結果を示している。

発明を実施するための最良の形態

HCV タンパクをコードするゲノムについては、cDNA のクローニングもなされており、そのゲノムの構成も明らかにされている。例えば、図 1 に示すように、HCV-JK1 cDNA は、3010 のポリタンパク前駆体をコードしており、それは、ウイルス及び宿主のプロテアーゼによりプロセッシングされて、少なくとも 10 個の生成物となる。そして、その最も C 末端に位置し、591 アミノ酸からなる NS5B は他のウイルスとの配列比較により、RdRP ポリメラーゼをコードすると考えられている (Honda, M., S. Kaneko, M. Unoura, K. Kobayashi, and S. Murakami, 1993, Arch Virol. 128:163-169)。

この、HCV-JK1 cDNA の内、591 アミノ酸からなる NS5B をコードする DNA の塩基配列及び推定のアミノ酸配列を、配列表の配列番号 1 及び 2 に示す。なお、本明細書及び図面では、便宜上、DNA のヌクレオチド配列を大文字で示したが、それらは後記の配列表の対応する配列番号に小文字で記載され



ているヌクレオチド配列と同一のDNAを表している。

本明細書の実施例では、RdRP活性を有する組換え型NS5Btを、HCV-JK1c DNAのNS5Bを出発物質として製造しているが、本発明の目的に適う限り、任意のHCV由来のRdRPをコードするNS5Bを用い、本明細書の記載と同様にして活性型組換えNS5Btタンパクを製造することができる。

5 即ち、目的とするHCV由来のNS5Bのアミノ酸配列が既知である場合には、その配列からアンカー領域を特定し、既知でない場合には、常法通り、配列を決定した後、その配列に基づいて、アンカー領域を特定することができる。欠失させるべきアミノ酸の数は、NS5Bの起源であるHCVタンパクに依じて適宜選択される。次いで、アミノ酸配列を決定したNS5Bt（即ち、第1のポリペプチド）をコードするDNAを、合成又は適当な手段で得、適当な第2のポリペプチドとの融合タンパクをコードする発現ベクターを構築し、宿主細胞を形質転換し、形質転換体を培養して活性型生成物を回収する。そのような方法は当業者にとって、通常の技術範囲のことである。

10

ここで、第2のポリペプチドとしては、それをコードするDNAと、目的のNS5BtをコードするDNAとを用いて適当な宿主細胞を形質転換したとき、RdRP活性を有する融合タンパクとして発現され、かつRdRP活性になんらの悪影響を及ぼさない限り特に限定されない。しかしながら、第2のポリペプチドは、融合タンパクの精製、回収に好都合な性質を有するものであることが好ましく、さらには、融合タンパクからNS5Btを分離することが可能であれば、さらに好ましい。

15

20

そのようなポリペプチドとしては、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）が例示されるが、マルチクローニングサイトを有する発現ベクターの入手の容易性、及びアフィニティー精製が可能である点などからGSTが好ましい。

従って、本発明の1つの実施態様では、ヒトC型肝炎ウイルスのRdRP由来の可溶型ポリペプチドは、配列表の配列番号1及び2に記載のアミノ酸配列において、アミノ酸番号1から570までの配列、又は該配列においてアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつポリメラーゼ活性を有す

25

るものである。

アミノ酸の欠失、置換若しくは付加を導入すべき位置、アミノ酸の種類、数などは、本明細書に開示した配列、及びポリメラーゼ活性の測定法に基づいて、当業者が決定することができる。

5 本発明の組換え型RdRPは、新規であり、C型肝炎の予防及び治療に有用である。従って、本発明は、該組換え型RdRPをコードするDNA、該DNAを含有する発現ベクター、及び該発現ベクターで形質転換された形質転換体を提供するものである。

10 以下、HCV-JK1cDNA由来のNS5BとGSTを例に、本発明を詳しく説明する。

15 なお、本明細書中では、HCV-JK1cDNA由来のNS5Bタンパク、及びそれから導かれるNS5Btタンパクをいずれも、単にNS5B及びNS5Btと称する。また、NS5BtとグルタチオンSトランスフェラーゼ（以下、GSTと称する）との融合タンパクをGST-NS5Btと称し、本発明方法で製造された組換え型のNS5Btタンパクを、rNS5Bt又はNS5Btと呼称する。さらに、本発明の目的から、「発現ベクター」なる語句と、「発現プラスミド」なる語句を相互変換可能に用いる。

20 既述のごとく、HCV-JK1cDNAは、3010のポリ蛋白前駆体をコードしており、RdRPをコードするNS5Bは、その最もC末端側の591アミノ酸からなる（図1）。本発明者らによるHCVゲノムcDNAの解析によれば、配列番号1及び2の591アミノ酸からなるNS5BのC末端部分に非常に疎水性に富む領域（aa570-586（全配列の2989-3005に対応））があり、C末端側の21アミノ酸（配列番号1及び2におけるNo. 571-591（2990-3010））付近がアンカー領域と考えられる（図1の中段で陰影を付した部分）。本発明者らはこのアン

25 カー領域部分のアミノ酸が欠失された変異体（NS5Bt）と、GSTとの融合蛋白を遺伝子組換え法で宿主細胞に発現させ、極めて効率よくRdRP活性を有する、融合又は非融合型の、可溶性NS5Btタンパクを得ることに成功した。

591アミノ酸からなるNS5B、及びC末端側から一定数のアミノ酸が欠失

されたNS5B tをコードするDNAは、合成するか、既知のHCV-JK1 c DNAから、制限酵素による切断又はPCR法などにより得ることができる。

配列番号1及び2に記載のNS5Bから欠失させるべきアミノ酸の数は、C末端の第591位のアミノ酸から、第571までのアミノ酸の領域で、任意の数のアミノ酸を欠失しさせたポリペプチドが好ましい。そのようなポリペプチドの例として、21アミノ酸を欠失したポリペプチドが挙げられる。

また、本発明の目的には、配列番号1及び2から導かれるC末端欠失ポリペプチド(NS5B t)のみならず、所望のRdRP活性を示すことを条件として、該ポリペプチドの、アミノ酸配列におけるRdRP活性を有する変異体も同様に有用である。そのような変異体は、例えば、アミノ酸番号1～570のアミノ酸配列からなるポリペプチドに、アミノ酸の欠失、置換及び／又は挿入を、当業者既知の方法で導入することにより誘導することができる。欠失及び付加は、N及び／又はC末端におけるアミノ酸の欠失及び／または付加を含む。得られた変異体のスクリーニングは、既知の方法で行うか、後述の参考例2に記載の方法で行うことができる。

任意の方法で得たNS5B tをコードするDNAと第2のポリペプチドであるGSTをコードするDNAとを適当な発現ベクター内で連結して融合タンパクの発現ベクターを構築する。そのような発現ベクターは、予め、NS5B tのDNAとGSTのDNAとを連結した後、適当な発現ベクターに挿入するか、あるいは、後述の実施例に記載のごとく、融合タンパクとしてGST及びNS5B tをコードするDNAが発現されるように、適当なGSTの発現ベクター[例、pGENK1 (Murakami, S.ら, 1994, J. Biol. Chem. 269:15118-15123; Yi, M.-K.ら, 1997, Virology 231:119-129) にNS5B tのDNAを挿入することにより、構築することができる。後述のプラスミドpGENKSは、プロテインキナーゼAのコンセンサスキナーゼ作用部位(kination site)、トロンビンの開裂部位及び付加的なマルチクローニングサイト(multiple cloning sites; EcoRI, SacI, KpnI, XmaI, SalI and BamHI)をコードしている。そして、このpGENKSベクターのマルチクローニングサイト(MCS)の上流には、GSTをコー

ドするDNAが挿入されていることから、本発明の目的に好適である。しかしながら、本発明は、任意の他の発現プラスミドを用いても実施することができる。

次いで、得られた発現ベクターで適当な宿主細胞（例、大腸菌）を形質転換し、適当な培地で培養すると、目的の融合タンパクが生産される。得られた融合タンパクの精製は、無細胞抽出液をGlutathion Sepharose 4B カラム（ファルマシア製）に吸着させ、1% Triton X-100含有リン酸緩衝化食塩水（以下、PBS）、次いでDTT含有トリス塩酸緩衝液で洗浄した後、グルタチオンを含む緩衝液で溶出し、高純度のGST-NS5Btを大量に得ることができた。次いで、必要に応じて融合タンパクから非融合型のNS5Btタンパクを分離することができる。

以下に実施例を挙げて本発明を詳しく説明するが、これらは本発明を制限するものではない。以下の実施例で用いたプラスミド類、様々な制限酵素やT4 DNAリガーゼ、その他の酵素類は、市販品から入手し、供給者の指示に従って使用した。また、DNAのクローニング、各プラスミドの構築、宿主の形質転換、形質転換体の培養及び培養物からの酵素の回収は、当業者既知の方法、あるいは文献記載の方法に準じて行なった。

#### 参考例1 ウェスタンブロッティング

##### (1) NS5Bに対する抗血清の調製

抗血清は、完全フロイドのアジュバント（Sigma Chemicals Co. Ltd.）中の、200  $\mu$ gの精製細菌性ヘキサヒスチジン-標識NS5Btをウサギに皮下注射することにより、ウサギ内で惹起した。抗血清のIgG画分は、供給者（Pharmacia LKB Co. Ltd.）の指示に従って、Protein A Sepharoseカラムを用いて精製した。抗血清及び精製IgG画分の両方をウェスタンブロッティングに用いた。

##### (2) ウェスタンブロッティング

試料（大腸菌又は哺乳動物細胞抽出液（リゼイト）から調製）タンパクをSDSサンプルバッファー（62.5 mM Tris-HCl（pH 6.8）、2% SDS、10% グリセロール、5% 2-メルカプトエタノール）に懸濁し、5分間加熱し、10% SDS-PAGEで分画し、展開液（192 mM グリシン、25 mM Tris 及び20%メタノール）

中のニトロセルロース膜 (Schleicher及びSchuell Co. Ltd.) に電氣的に移行させる。次いで、抗-NS 5 Bを用いて、発現された様々な組換えNS 5 Bタンパク類を常法通りウエスタンブロッティングにより検出する。バンドは、供給者 (Amersham社) の指示に従い、ECL (商品名: ECLウエスタンブロッティング検出試薬セット, カタログコードRPN2106P, Amersham社) を用いて観察した。

#### 5 参考例2 ポリメラーゼ活性の測定

NS 5 B、GST-NS 5 B t及びrNS 5 B t、及びそれを含有する試料のRNA依存性RNAポリメラーゼ活性の測定は、原則として、以下の方法で行った。なお、同時に他のポリメラーゼ活性 (逆転写酵素活性、DNA依存性RNAポリメラーゼ活性、DNA依存性DNAポリメラーゼ活性) 及びターミナルトランスフェラーゼ (TT) 活性も測定した。

上記活性は、文献 (Behrens, S. E. ら, EMBO J. 15:12-22, 1996; De Francesco, R. ら, Methods Enzymol. 275:58-67, 1996; Lama, J. ら, J. Biol. Chem. 270:14430-14438, 1995) に記載の方法に従い、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  UMP又は $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dTMPの取り込みに基づいて評価した。

標準的な反応 (10  $\mu$ l) は、20mM Tris-HCl (pH7.5), 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 1mM DTT, 1mM EDTA, 20U RNase inhibitor (和光純薬), 2  $\mu$  Ci  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  UTP (800 Ci/mmol, Amersham Co. Ltd.), 10  $\mu$  M UTP, 10  $\mu$  g/ml poly (A) 及びoligo (U) 14を含有するバッファー中で行った。上記反応液に精製NS 5 B tを加え、25℃で2時間インキュベートした後、サンプルをDE 81 フィルター (Whatman Co. Ltd.) に移し、反応を止めた。フィルターを、0.5M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH7.0) で十分に洗浄し、70%エタノールでリンス後、風乾した後、最終的にフィルターに結合した放射能を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

2) RdRP活性の測定には、oligo(U)14及びoligo(dT)の両方をプライマーとして用いた。RT活性の測定には、poly(A)、oligo(dT)及び $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dTTPを、それぞれ、テンプレート、プライマー及び基質として用いた。RNAポリメラーゼ活性の測定には、poly(dA)、oligo(U)、及び、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  UTPを用いた。大腸菌由来のポリメラーゼの影響の検討のために、リファンピシン

(Rifampicin) 及びアクチノマイシンD (シグマ社) をエタノールに溶解し、反応系に加えた。

### 3) RNA依存性RNAポリメラーゼ (RdRP) アッセイ

RdRP活性は、全量40  $\mu$ lの反応液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 1mM EDTA, 20U RNase インヒビター(和光純薬), 50  $\mu$ g/mlアクチノマイシンD (Sigma Co. Ltd.), 5  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP及び各0.5mMの残りのNTP類 (即ち、ATP, CTP及びGTP)と、10  $\mu$ g/ml RNAテンプレートとを用いて行った。制限ヌクレオチドの濃度を、10  $\mu$ Mに調節した。精製NS5 Btサンプルを添加後、反応混合物を、30℃で2時間インキュベートした。インキュベーション後、等量の2×プロテインアーゼKバッファー (300 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% SDS)を加え、50  $\mu$ gプロテインアーゼK (Boehringer Mannheim Co. Ltd.)で30分間消化することにより、反応を止めた。RNA産物をフェノール-クロロホルム (1:1)で抽出し、エタノール沈殿に付し、8M尿素-8%PAGEで分析した。電気泳動の後、ゲルを乾燥し、イメージングプレート (Imaging plate) に暴露し、BAS 1000 Bioimage アナライザー (Fuji Co. Ltd)で解析した。

### 実施例1 組換え型GST-NS5Bt及びNS5Btの製造

#### 1. プラスミドpGENKSの構築

GST融合型組換えタンパク発現プラスミドpGENKSは、pGENK1 (Murakami, S. ら, 1994, J. Biol. Chem. 269:15118-15123; Yi, M.-K. ら, 1997, Virology 231:119-129) をEcoRI及びBamHIで消化し、pGENK1EcoRI/BamHIベクターを作成し、以下のマルチクローニング部位をコードする合成オリゴヌクレオチドを挿入した。

SSFor (配列番号4) GAATTCGAGC TCGGTACCC CCGGGGTCGA CGGATCC

SSRev (配列番号5) GGATCCGTCG ACCCGGGGGG TACCGGAGCT CGAATTC

上記合成オリゴヌクレオチドをNaCl存在下に65℃でアニーリングし、EcoRI-BamHIで消化し、フェノール-クロロホルムで抽出、エタノール沈殿後、トリスEDTA溶液 (以下、TE) に溶解し、上記ベクターにライゲーション

ン・ハイ (ligation high ; 東洋紡) にて供給者の指示に従い、ライゲーションをした。その後、大腸菌株XL1-Blueに通常の方法により形質転換し、プラスミド p GENKS を作成した。

5 プラスミド p GENKS はプロテイナーゼ A のコンセンサス配列、トロンビン開裂認識部位及びマルチクローニングサイト (EcoRI、SacI、KpnI、XmaI、SalI、BamHI) をコードしており、この上流に GST をコードする DNA 配列がある。このプラスミド p GENKS の制限地図を図 2 に、構築の模式図を図 3 に示す。図 3 において、GST-NS5Bt 融合タンパクのトロンビンによる切断箇所は下線で示されている。

## 10 2. 大腸菌の形質転換

大腸菌の形質転換は、通常の分子生物学的な方法で行う。プラスミド DNA 又はライゲーション反応液を 60  $\mu$ l のコンピテント大腸菌に加え、氷上にて 30 分間インキュベートし、その後、42℃にて約 1 分間、続いて氷上で 2 分間インキュベートし、SOC 溶液を加え、37℃で 45 分間培養後、100  $\mu$ g/ml ア

15 ンピシリン含有 LB プレートにプレーティングし、約 12 から 20 時間、37℃で培養し、形質転換体を得る。

## 3. GST-NS5Bt の発現ベクター p GENKS / NS5Bt の構築

### (1) NS5B の DNA の調製

20 NS5B を含有する HCV JK1 のサブゲノムの cDNA (Honda, M. ら, 1993, Arch Virol. 128:163-169) を、タンパク合成開始コドン、人工的 SacI 及び SalI 制限部位を有する以下の 1 組のプライマーを用いて PCR 法でサブクローニングした。

GGGAGCTCCA TGTCATGTCT TACACGTGGAC A (NS5B For) (配列番号6)

GGGTCGACCC GGTTCGGGAGC AGGTAGATGCC (NS5B Rev) (配列番号7)

25 これら 2 つのプライマー、及び Taq ポリメラーゼ (TaKaRa Ex Taq ; 宝酒造社製) を用い、供給者の指示に従って、以下の手順で PCR を行った。すなわち、(94℃, 1 分 ; 58℃, 1 分 ; 72℃, 2 分) からなる一連の処理を 30 サイクル行った。

この操作により、約1.7 kbのNS5BのcDNAがPCRにて増幅された。そして、このPCR産物を低融点アガロースゲル電気泳動にかけ、DNAバンドを切り出し、通常フェノール、クロロホルム、エタノール沈殿を用いて回収した。この回収したcDNAをSac I及びSal I制限酵素（宝酒造）にて処理し、フェノール、クロロホルム処理、及びエタノール沈殿し、精製後、次の段階に用いた。

## (2) pGENKS/NS5Bの構築

NS5B全長を発現するプラスミドをまず構築した。pGENKSをSac I及びSal I制限酵素にて処理し、pGENKS Sac I/Sal Iベクターを作成し、

(1)で得たNS5B cDNA Sac I/Sal I断片を、T4 DNAリガーゼのキットであるライゲーション・ハイ（東洋紡）を用い、供給者の指示に従い、ライゲーション反応を行い、大腸菌へ形質転換し、pGENKS/NS5Bを得た。

## (3) pGENKS/NS5B tの構築

C末端の21アミノ酸が欠失されたNS5B tは、上記(2)で得られたpGENKS/NS5Bを鋳型とし、NS5BForと、次ぎのプライマー（NS5BtRev）：

GGGTCGACGC GGGGTCGGCA CGAGACAGGCT（NS5BtRev）（配列番号8）

を用い、上述と同様の方法でPCR反応を行い、NS5B t cDNAを作成し、同様の方法でpGENKS/NS5B tを得た。

## (3) 大腸菌形質転換体によるGST-NS5B tの発現とその精製

上記2に記載の方法で大腸菌株を形質転換し、以下の方法で培養し、発現産物を精製した。

精製の様々な段階で試料を採取し、SDS-10%PAGEにより分離し、タンパク濃度を測定した。同時に、参考例1に記載のウエスタンブロッティング（抗NS5B及び抗GST抗体を用いる）で分析した。なお、タンパク濃度は、ブラッドフォード法（Bradford method）又はウシ血清アルブミン（BSA）を標準とするCoomassie 染色法（CBB）で測定した。さらに、様々な精製段階における試料のポリメーゼ活性を、参考例2及び後述の(7)に記載のごとく、UMP取り込みに基づいて検討した。これらの結果は、図4及び表1に記載され



ている。

1) タンパクを産生する細菌の調製

pGENKS/NS5Btプラスミドで形質転換し、得られた大腸菌株  
(BL21pLysS)の1コロニーを、10mlの100 $\mu$ g/mlアンピシリン含有LB培地に  
5 懸濁し、30℃で一夜、前培養した。この培養物を100 $\mu$ g/mlアンピシリン含有  
LB培地1lで希釈し、30℃でOD<sub>600</sub>が0.6から0.7になるまで培養し、  
これらの培養物に、0.4mMイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド (IPTG)  
を加え、一夜誘導した。

この培養物1lを遠心し、大腸菌を収穫し、リン酸緩衝化食塩水 (PBS)で一  
10 回洗浄した。次いで、このペレットを1mMジチオスレイトール (DTT) 及び  
1% Triton X-100 含有PBS (以下、バッファA) 32mlに懸濁した。

2) 超音波処理

懸濁液を氷上で、粘性が無くなるまで超音波処理し、15,000gで20分間遠心し  
た。上清1 (S1) とペレットを分離し、上清(S1)を氷上に放置した。ペレッ  
15 トを1.0M NaClを含有するバッファA 32mlに懸濁し、懸濁液を同様  
に超音波処理し、遠心した上清を集め (S2)、上記のS1と混合し、バッファ  
AでNaCl濃度を0.33Mに調節し、上清3 (S3)を得た。

3) DEAE Sephacelによる精製

S3をバッファAで平衡化したDEAE<sup>-</sup>Sephacelカラムに通し、通過後の  
20 分画を得た。

4) グルタチオンセファロース4Bカラムによる精製

上記3) で得た画分を、バッファA中で平衡化した、グルタチオンセファロ  
ース4Bビーズ (glutathione Sepharose 4B beads; Pharmacia Biotech Co.  
Ltd.) 1mlと混合し、4℃で1時間、タンパク質をビーズに吸収させた。次いで、  
25 このビーズを、バッファA、次いで1mM DTT含有50mM Tris-HCl (pH  
8.0) で完全に洗浄し、溶出バッファ [50mM Tris-HCl (pH 8.0)、10mMグル  
タチオン、10mM DTT及び0.1%Triton X-100] 4mlで溶出した後、500mM N  
aClを含有する溶出バッファ4mlで溶出した (図4Aレーン4)。

## 5) ヘパリンセファロースカラムによる精製

次いで、溶出液のNaCl濃度を150mMに調節した後、150mM NaCl含有溶出バッファーで平衡化したヘパリンセファロースカラム (Pharmacia Biotech Co. Ltd.)に適用した。150mM NaClを含むLGバッファーで洗浄した後、カラムをNaCl濃度が100mM~1MのLGバッファー [20mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA, 5mM DTT, 20% グリセロール, 0.5% Triton X-100] で溶出し、それぞれの分画に分離した。

溶出液を10% SDS-PAGEで分析した結果、GST-NS5Btは500mM~900mMの広いNaCl濃度範囲で溶出していた。

## 6) poly (U) セファロースカラムによる精製

上記5) で得た画分を集め、LGバッファーでNaCl濃度を150mMに調節した。次いで、この溶液を150mM NaCl含有LGバッファーで平衡化したpoly(U)セファロースカラム (Pharmacia Biotech Co. Ltd.)に適用した。

150mM NaClを含むLGバッファーで洗浄した後、カラムを200mM~1MのNaClを含有するLGバッファーで溶出した。5) と同様10% SDS-PAGEで分析した結果、GST-NS5Btは、NaCl濃度500mM~700mMの範囲に溶出された。この画分を集め、150mM NaCl含有LGバッファーに対して透析した (図4Aレーン5)。

## (5) 非融合型rNS5Btの精製

上記(4)、4)において調製した、グルタチオン樹脂に結合したGST-NS5Btをトロンビンで処理してGSTとの結合部位にある人工的なコンセンサス配列 (図3の下線部分) で切断した。即ち、GST-NS5Btが結合したグルタチオンビーズ (グルタチオンセファロース4Bビーズ) を、トロンビン開裂バッファー ((50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100) で十分に洗浄した。次いで、トロンビン (50 U) (Pharmacia Biotech Co. Ltd.)を含有するトロンビン開裂バッファーを用いて、4℃で一夜、処理することにより、GSTキャリアーから、GSTと融合したNS5Btタンパクを遊離させた。ビーズを遠心し、NS5Btタンパクを含有する上清を15

0 mM NaCl を含有する LG バッファーに対して透析し、得られた試料を、タンパク濃度の測定及びウエスタンブロッティングにより分析した (図 4 A、レーン 6)。さらに、ポリメラーゼ活性も測定した。

#### (6) 精製の効果

5 各精製工程での精製度の変化を図 4 に、ポリメラーゼ活性の変化を表 1 に示す。図 4 において、A は試料を SDS-10% PAGE により分離し、Coomassie 染色法 (CBB) で染色した結果の模写図である。レーン 1 は全細胞抽出液 (lysate) ; レーン 2 は超音波処理物の遠心上清 ; レーン 3 は DEAE Sephacel に通した後の無細胞抽出液 ; レーン 4 はグルタチオンセファロース 4 B  
10 カラムからの溶出液 ; レーン 5 は poly (U) Sepharose カラムからの溶出液 ; レーン 6 はトロンビン処理後の非-融合型 r NS 5 B t を表す。B はこれら 6 つの精製段階の試料を、抗 NS 5 B 抗体を用いるウエスタンブロッティング、C は抗 GST 抗体を用いるウエスタンブロッティングに供して得た結果の模写図である。

15 図 4 A レーン 5 に示すように、95 kDa の組換え GST-NS 5 B t タンパクが純度 90% 以上で得られた。

この 95 kDa のバンドをウエスタンブロッティングで分析した結果、ウサギ抗 NS 5 B t IgG 及び抗-GST IgG の両者によって特異的に認識された

(図 4 B 及び C のレーン 5)。次いで、この 95 kDa のバンドに相当する精製された GST-NS 5 B t タンパクを HCV 1 b 型感染慢性肝炎患者血清及び健常人血清を用いたウエスタンブロッティングで分析した。図 5 において、レーン 1 は精製された GST-NS 5 B t、レーン 2 は対照の GST タンパクのみを示す。  
20 約 95 kDa の GST-NS 5 B t が HCV 1 b 型感染慢性肝炎患者血清によって特異的に認識された (矢印)。図 4 及び図 5 に示す結果から、精製された GST-NS 5 B t は HCV ウイルスに由来するタンパクであると確認された。この  
25 結果はまた、得られたタンパクが、組換え GST-NS 5 B t であることを証明するものである。

図 4 A のレーン 6 には、トロンビン消化物の非-結合画分の約 63 kDa のタ

ンパクに相当する位置に2重バンドが観察される。このバンドは、ウエスタンブロッティングにおいて、抗-NS 5 B t IgGにより特異的に認識されるが、抗-GST IgGには認識されないことから、非-融合型のrNS 5 B t タンパクであることが確認された (図4 B及びC)。

- 5        また、表1から、精製GST-NS 5 B tのUMP取り込みが検出され、相対活性は少なくとも10,000 倍以上であることが分かる。トロンビン切断非-融合NS 5 B tは、融合タンパクよりもやや低い、UMP取り込み活性を示した。

最終的に精製された、融合タンパク (GST-NS 5 B t) 及び非-融合タンパク (NS 5 B t) タンパクは150mM NaCl含有LG-バッファーに対して十分に透析し、-80℃で保存した。

10

#### (7) ポリメラーゼ活性の検出

上記(6)で精製した純度90%以上の精製GST-NS 5 B tのポリメラーゼ活性は、参考例2に記載の方法に従って分析した。即ち、基質としての[ $\alpha$ - $^{32}$ P]UMP又は[ $\alpha$ - $^{32}$ P]dTMPの取り込みを、精製GST-NS 5 B t (90 ng)を用いて測定した。結果を、図6に示す。図中、Aは、poly (A) 又は poly (dA) をテンプレートとし、oligo (U) 14又はoligo (dT) をプライマーとして用いた場合の基質特異性を示している。Bは25℃及び37℃での反応のタイムコースである。CはGST-NS 5 B tの量と、UMP取り込みとの関係を示す。

15

20        図6から、明らかに、UMP取り込みは、量依存性に増加する。

アッセイにおけるPoly(A)依存性のUMP取り込みは、oligo(U)プライマーを用いた場合の方が、oligo(dT)プライマーを用いた場合よりもはるかに高い(約2倍) (図6 A)。また、精製GST-NS-5 B tは、試験した条件下で、逆転写酵素活性、DNA依存性RNAポリメラーゼ又はDNAポリメラーゼ活性のいずれも、示さなかった。(図6 A)。

25

取り込みは、25℃で、少なくとも4時間継続した。しかし、37℃では速度が低く、2時間継続した時点で一定になった(図6 B)。

表1 HCV RNAポリメラーゼの精製

| 精製段階        | 濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 取り込み*<br>(cpm)   | 比活性**  | 相対活性*** |
|-------------|-------------------------|------------------|--------|---------|
| 全細胞リゼイト     | 18000                   | 1319 $\pm$ 230   | 0.0009 | 1       |
| 超音波処理上清     | 6000                    | 1485 $\pm$ 82    | 0.003  | 3.4     |
| DEAE 通過     | 5900                    | 1558 $\pm$ 53    | 0.0003 | 3.6     |
| グルタチオン溶出    | 350                     | 12462 $\pm$ 2281 | 0.44   | 485     |
| Poly (U)カラム | 90                      | 67740 $\pm$ 1413 | 9.41   | 10271   |
| トロンビン開裂     | 280                     | 47280 $\pm$ 3771 | 2.11   | 2344    |

\* :  $[\alpha - ^{32}\text{P}]$  UMPの反応への取り込み\*\* : pmole/ $\mu\text{g}$ /時

\*\*\* : 全細胞抽出液の取り込みを標準とする。

- 5        また、ポリメラーゼ活性に及ぼす様々な因子の影響を調べた。結果は図7、8及び表2、3に示されている。

10        表2に示すように、UMP取り込みはGST単独の場合には観察されないことが分かる。さらに、プライマー又はテンプレートなしでも、UMP取り込みは観察されず、NS5Bタンパクが、ターミナルトランスフェラーゼ活性を持たないことが分る (表2)。これは、昆虫細胞で発現されたNS5Bの活性と異なる性質である。

      また、NS5Bは、 $20\mu\text{g/ml}$ リファンピシン又は $50\mu\text{g/ml}$ のアクチノマイシンDの存在下では、阻害されず、それぞれの $200\mu\text{g/ml}$ 及び $500\mu\text{g/ml}$ まで濃度を増加した場合でも阻害されなかった (表2)。

表2 GST-NS5B tにおけるRdRP活性のまとめ

|                            | UMP取り込み(cpm) | %活性  |
|----------------------------|--------------|------|
| 完全                         | 99448±2170   | 100  |
| -プライマー[oligo(U)]           | 1124±88      | 1.12 |
| -テンプレート[poly(A)]           | 2429±1142    | 2.43 |
| -プライマー、-テンプレート             | 1521±299     | 1.52 |
| Rifampicin (20 µg/ml) *    | 25175±4628   | 105  |
| Actinomycin D (20 µg/ml) * | 23894±5467   | 100  |
| -Mg <sup>2+</sup>          | 738±94       | 0.74 |
| GST                        | 423±14       | 0.42 |
| -タンパク                      | 1241±242     | 1.24 |

\* : コントロールは等量のエタノールを含有含有している。

様々な条件下での精製GST-NS5B tのUMP取り込みに基づくRdRP活性を調べた。反応は、GST-NS5B t (30~45 ng) を用いた。至適pHの検討は、リン酸ナトリウムバッファー中、25℃で2時間インキュベートして行った。結果を図7及び8に示す。

図7において、AはpH、Bは温度、CはKCl濃度、図8において、DはMg<sup>2+</sup>イオン、EはZn<sup>2+</sup>濃度 (0、10、25及び50 µM) を変化させた場合のUMP取り込みを示す。結果は以下の通りである。

1) UMP取り込みの至適pHは広く、中性付近である (図7 A)。

2) UMP取り込みは、30℃で最も効果的である (図7 B)。

3) UMP取り込みは、100 mM KCl以上のKCl濃度により阻害され、Mg<sup>2+</sup>イオンに厳密に依存しており、Mg<sup>2+</sup>の至適濃度は2.5~5 mMの範囲である (図8 D)。

4) Zn<sup>2+</sup>等の他の2価イオンはUMP取り込み活性になんら影響しない (図8 E)。

また、界面活性剤の影響を調べた結果、イオン性界面活性剤 (0.01% Sarkosyl又はSDS) は、活性を完全に阻害したが、0.1% までの非イオン性界面活性剤 (例、Triton X-100, Nonidet P-40, Tween 20 及び CHAPS) は、殆ど影響しないことが分かった (表3)。

表3 活性に対する界面活性剤の影響

| 界面活性剤*       | 0.01%** | 0.1%** | 1%**  |
|--------------|---------|--------|-------|
| Triton X-100 | 90.8    | 89.2   | 61.8  |
| Nonidet P-40 | 97.2    | 98.7   | 63.1  |
| Tween 20     | 104.5   | 121.0  | 118.9 |
| Tauro DOC    | 81.2    | 12.6   | 12.6  |
| SDS          | 4.6     | 4.1    | 5.0   |
| Sarcosyl     | 28.8    | 7.5    | 3.6   |
| CHAPS**      | 83.2    | 85.6   | 100.8 |

\* : 標準反応 (界面活性剤不含) での活性 (25755cpm) を100%とする。

\*\* : 最終濃度 (v/v)

\*\*\*: CHAPS濃度はそれぞれ、0.1mM、1mM及び10mM。

(8) HCV RNAをテンプレート及びプライマーとするRNA合成アッセイ

上記(7)のUMP取り込み試験では合成のテンプレートとプライマーとを使用した、GST-NS5BtがHCV RNAをテンプレート及びプライマーとして使用し得るか否かを検討した。反応は、上記のRNAポリメラーゼアッセイと同様の反応液を用い、30℃で2時間の条件で行った。

HCVの3'UTR (これは、複製開始部位として機能すべき部位) を図9Aに示すように、3つの領域に分割した。5BBgは、NS5BのBglII部位から3'UTRまでの領域; poly(U)はpoly(U)ストレッチ; そして3'XはHCVゲノムRNAの3'末端における高度に保存された配列であり、ウイルスの複製に重要な役割を果たしていることが示唆されている3'Xを含有している

(Kolykhalov, A. A.ら、J Virol. 70:3363-3371, 1996; Tanaka, T.ら、J Virol. 70:3307-3312, 1996)。これらの各種のHCVサブゲノムRNAをインビトロ転写で合成し、RNA合成アッセイに用いた (図9A参照)。

#### 1) テンプレートの作成

RNAテンプレートを調製するために、各種のプラスミド (pGEM3zf(+)/NS5BBg、pGEM3zf(+)/poly(U)、及び pGEM3zf(+)/3'X) を構築し、インビトロ転写によりRNAテンプレートを調製した。これらのプラスミドは、

下記の合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いてPCRで構築した。

pGEM3zf(+)/NS5BBglは、プライマー：

GCGGATCCAG ATCTACGGGGC CACTTA (5BBgFor) (配列番号9)

GCGAATTCAA GACAAAGGGAA TGGCCTAT (5BBgRev) (配列番号10)

- 5 (これらは、それぞれ、合成のBamH I及びEcoR I部位を有する)を用い、EcoR I及びBamH I部位の間にHCV JK-1 cDNAを含有しているpGEM3zf(+)/HCV JK-1をテンプレートとするPCRで構築した。

pGEM3zf(+)/poly(U)は、オリゴヌクレオチド：

GCGAATTCGA AGACTTCCCTT TTTTTTGT TTTTTTTTTT CTTTTTTTTT

- 10 TTTCTTTTTT TTCCTTTTTT TTTTTCT (polyUFor) (配列番号11)

GCGGATCCGA AGACGCCACCA AAGAAGGAAAA GGGAAAAAAAA AAAACAAAGAA

GAAAAAAAA AAAAGGAAAA AAAGA (polyURev) (配列番号12)

- 15 (これらは、それぞれ、合成のEcoR I, BamH I及びBbs I部位を有する)をアニーリングしてPCRクローニングに供し、HCVのpoly(U)ストレッチを有するフラグメントを得、このDNA断片をpGEM3zf(+)(Promega Co. Ltd.) EcoR I and BamH Iベクターに挿入することにより構築した。

pGEM3zf(+)/3' Xは、1組のオリゴヌクレオチド：

GCGAATTCGA AGACTTGGTGG CTCATCTTAG CCCTAGTCACG GCTAGCTGTGA

AAGGTCCGTG AGCCGCATGAC TGCAG (3' X For) (配列番号13)

- 20 GCGGATCCCT TAAGACATGAT CTGCAGAGAGG CCAGTATCAGC ACTCTCTGCAG

TCATGCGGCT CAC (3' X Rev) (配列番号14)

- 25 (これらは、それぞれ、合成のEcoR I、Bbs I、AflII及びBamH Iする)をアニーリングしてPCRクローニングに供し、3' X (Kolykhalov, A. A. ら, 1996, J Virol. 70:3363-3371; Tanaka, T. ら, 1996, J Virol. 70:3307-3312)を含むフラグメントを得、EcoR I及びBamH I部位を有するDNA断片をpGEM3zf(+)(Promega Co. Ltd.) EcoR I and BamH Iベクターに挿入することにより構築した。

全構築物をTaq sequencing kitsとDNA sequencer (374A, Applied



Biosystems Co. Ltd.)で配列を確認した。

## 2) テンプレートの作成

上記のプラスミドpGEM3zf(+)/5BBg、pGEM3zf(+)/poly(U)、及び  
pGEM3zf(+)/3'Xを、BamH I又はEcoR Iにより消化し、線状化した。一方、後  
5 述の試験例1に記載の方法で構築したpNKFLAGをBglIIで消化し、コント  
ロールRNAの作成に用いた。

これらのテンプレートを用いる試験管内転写は、T7 RNAポリメラーゼ又は  
SP6 RNAポリメラーゼ (Promega Co. Ltd.)を用い、供給者の指示に従って  
行った。

10 インキュベーションの後、DNAテンプレートをRNase不含-DNaseで消化  
した。RNA生成物をフェノールクロロホルム (1:1)で抽出し、Sephadex  
G-50カラム (Pharmacia Biotech Co., Ltd.) を通して遊離のヌクレオチドを除  
去した後、エタノール沈殿に付した。RNAの濃度を分光光度法により測定し、  
RNase除去蒸留水にて1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  に調節し、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。

15 RNAサンプルの品質は、MOPS 変性ゲル又は尿素変性ポリアクリルアミ  
ドゲルを用いる電気泳動によって確認した。

参考例2、3)の記載に準じて、RNA依存性RNAポリメラーゼ (RdR  
P) アッセイを行った。RNA生成物は、プロテイナーゼK処理後、フェノール  
クロロホルムによる抽出の後、エタノール沈殿、及び最後に8M尿素含有8%  
20 PAGEで分離、精製した。なお、各RNAのサイズは図9Aに記載の通りであ  
る。

結果を図9Bに示す。入力したRNAよりもやや大きい、新しい、放射性-標  
識バンドが検出された (図9B、レーン1、3、4)。

本発明のGST-NS5BtによるRNA合成は、4種のリボヌクレオチド全  
てを基質として必要とし、UTP又はCTP単独を基質として用いた場合には、  
25 取り込みは検出されなかった。HCV RNA及びコントロールRNAは、テン  
プレート及びプライマーとして作用した (図9)。HCV 3'UTRの3'Xを用  
いるRNA合成能は、他のRNAに比較してやや低く (図9、レーン1及び4と、

3とを比較)、HCV 3' UTRのpoly(U) ストレッチはそれ自体では、テンプレート及びプライマーとして作用しなかった(図9、レーン2)。これらの結果は、RNAがテンプレート及びプライマーとして利用されること、及び、UMP取り込みアッセイで示されたように、GST-NS5Btがターミナルトランスフェラーゼ活性を持たないことを示している。

以上(7)及び(8)から、本発明の大腸菌形質転換体により発現された組換え型GST-NS5Bt及び組換え型NS5Btのいずれも、RdRPに共通の性質(テンプレート及びプライマーの要求、 $Mg^{2+}$ 依存性、及び至適反応条件等)を有する活性な可溶性タンパクであることが分かる。なお、本発明のGST-NS5Bt及びNS5Btは、ターミナルトランスフェラーゼ活性は示さない点で、従来の昆虫細胞で発現された組換え型NS5Bと、活性においても異なる。

#### 試験例1 GST-NS5Bt及びNS5Btの活性とアミノ酸配列との関係

様々なアミノ酸配列における変異体を作成し、変異がRdRP活性に及ぼす影響を検討した。

NS5Btの変異体としては、あらゆるRdRP間で高度に保存されている、HCV NS5BのGDDモチーフにおける置換変異体(NS5Bt-m1)、YRHRARにおける変異体(NS5Bt-m2)及びCGYRRCRにおける変異体(NS5Bt-m3)をデザインした(図1参照)。

これらの変異体は、GDDのVDD(配列番号1及び2におけるアミノ酸番号317-317(HCV蛋白におけるアミノ酸番号2736-2738、以下同様))による置換、YRHRARのAAAAAA(500-505(2919-2924))による置換、及びCGYRRCRのAAAAAA(274-280(2693-2699))による置換変異体である。

これらの置換変異体をコードするDNAは、突然変異誘発用に設計されたプライマー、NS5BFor及びNS5BtRevを用いるオーバーラップエクステンションによるPCR突然変異誘発法により調製した(Yi, M.-K.ら, 1997, Virology. 231:119-129)。

NS5BのC末端領域における置換変異体(NS5B-m4)は、NS5BForと以下の配列のNS5Bm4Revとをプライマーとして、PCRにより得た。

GCGGATCCTC ACCGGTTGGGG AGCAGGTAGAT GCCTACCCCGG AGAAGGTAGGA

GTAGGCACCA CAT

(NS5Bm4Rev) (配列番号15)

このNS5Bm4Revは、合成のBamHI部位を有しており、3'プライマーとして用いた。

NS5B-m4では、アミノ酸番号579及び582におけるL及びVがいずれもPに変換されている(図1参照)。

これら変異体の活性を測定し、結果を表4に示す。

表4 GST-NS5Bt突然変異体のRdRP活性

| タンパク                 | 取り込み(cpm) | %活性 |
|----------------------|-----------|-----|
| GST-NS5Bt (20 ng)    | 22085     | 100 |
| GST-NS5Bt-m1 (20 ng) | 359       | 1.5 |
| (40 ng)              | 248       | 1.1 |
| GST-NS5Bt-m2 (20 ng) | 70        | 0.3 |
| (40 ng)              | 172       | 0.7 |
| GST-NS5Bt-m3 (20 ng) | 124       | 0.5 |
| (40 ng)              | 113       | 0.5 |

大腸菌形質転換体から回収したGST-NS5Btの変異体タンパクのうち、NS5Bt-m1はRdRP活性を全く示さなかった(表4参照)。この結果は、GST-NS5Bt又はNS5Btタンパクは、RNA合成活性にGDDモチーフを必要とすることを示唆している。比較的塩基性残基の多いクラスターの置換変異体、NS5Bt-m2及びNS5Bt-m3も、全くRdRP活性を示さず、また、実施例1で得たGST-NS5Btと共存下で、そのRdRP活性を阻害しなかった(表4)。以上から、得られたRdRP活性がGST-NS5Bt由来であり、その活性にGDDモチーフが必須であることが分かる。

#### 試験例2 GST-NS5Btの哺乳動物細胞内での局在に関する検討

NS5BのC末端の21アミノ酸の欠失が、哺乳動物細胞におけるNS5Bの局在化に及ぼす影響を哺乳動物細胞(肝がん培養細胞系HLE細胞、及びHepG2細胞、非肝がん細胞COS1細胞)による一時的な(transient)発現系で検討した。

検出を容易にするために、緑色蛍光タンパク (green fluorescent protein, GFP) と、全長の NS 5 B、NS 5 B t 及び NS 5 B-m 4 との融合タンパクをコードする発現プラスミド構築した。これらのプラスミド、GFP 単独をコードするプラスミドで哺乳動物細胞 H L E を形質転換し、発現したタンパクの細胞内での局在を調べた。

#### (1) GFP との融合タンパクの哺乳動物細胞での発現のためのプラスミドの構築

p S G 5 U T P L (Lin, Y. ら、1997, J. Biol. Chem. 272:7132-7139; Murakami, S. ら、1994, J. Biol. Chem. 269:15118-15123) から調製した。

緑色蛍光タンパク (green fluorescent protein; GFP) の cDNA は、p h G F P - S 6 5 T (Clontech Co. Ltd.) をテンプレートとし、以下のプライマーを用いて P C R で調製した。

AAGATATCGC GGCCGCATGGT GAGCAAGGGCG AG (GFPNotFor) (配列番号16)

AAGGATCCGA ATTCTTG TACA GCTCGTCCAT (GFPEcoRev) (配列番号17)

これらは、それぞれ、合成の EcoRV、NotI 及び EcoRI 部位を有している。合成 EcoRV 及び BamHI 部位を有する DNA 断片を EcoRV、BamHI で処理し、p S G 5 U T P L の EcoRI 部位を Klenow フラグメントで平滑末端化した後、BamHI 消化したベクターに挿入し、p G F P を得た。この p G F P ベクターを用いてもう 1 つの哺乳動物発現ベクター p N K F L A G を構築した。

翻訳開始に関連した領域を有し FLAG-tag (標識) エピトープ配列をコードする配列を p F L A G H i s / p 5 3 (R. Roeder から入手) から、以下に示す P C R 法を用いて得た。この DNA 断片を、以下の 1 組のプライマー:

ATGCGGCCGCCACCATGGACTACAAAGACGAT (NKFLAGFor) (配列番号18)

CGGGATCCTCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCT (p53Rev) (配列番号19)

(これらは、それぞれ、合成の NotI 部位、コンセンサス翻訳開始部位、及び BamHI 部位を有する) を用い、P C R により、p G F P NotI and BamHI ベクターに挿入し、p N K F L A G / p 5 3 を得た。

プラスミド p N K F L A G は、上記のごとく、EcoRI 及び BamHI 部位を

用いて、p53 インサートをマルチクローニングサイトに置換することにより、構築した。

これらのプラスミド pNKFLAG 及び pGFP の EcoRI 及び BamHI 部位に、常法に従って、NS5B の DNA を挿入し、GFP-NS5B 発現プラスミド (pGFP/NS5B) 又は FLAG-標識-NS5B の発現プラスミド

(pNKFLAG/NS5B) を構築した。同様に、NS5Bt 及び NS5B-m4 をコードする DNA を挿入して、それぞれの発現プラスミドを構築した。

## (2) 哺乳動物細胞での発現

約  $1 \times 10^5$  の HLE 細胞をスライドグラス上にプレートし、Quadriperm の顕微鏡スライド培養ウエル (microscope slide culture well) (Heraeus Co. Ltd.) に置き、その翌日、GFP-NS5B 発現プラスミド (pGFP/NS5B) 又は FLAG-標識-NS5B の発現プラスミド (pNKFLAG/NS5B) でトランスフェクトした。PBS ですすいだ後、細胞を 1.5% パラホルムアルデヒド含有 PBS で固定した。次いで、100% 冷メタノールで 5 分間、後一固定した。それらを  $-25^{\circ}\text{C}$  で風乾し  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。GFP-融合タンパクは PBS 中、0.0005% Evans Blue で対比染色して検出した。FLAG-標識タンパクを発現している試料は、PBS 中、0.5% BSA でブロックし、0.5% BSA 含有 PBS で希釈 (1:330) した抗-FLAG M2 抗体で一夜染色した。

免疫染色は、標準的な手法により、吸収されたウサギ抗マウス IgG、ビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG、及びストレプトアビジン-FITC (Amersham 社) を用い、Evans Blue で対比染色することにより行った。

結果は、NIBA 及び WIB フィルターを備えた BX-50 蛍光顕微鏡 (Olympus 社) で観察し、デジタルプリンティング (Picrography 3000、Fuji Co. Ltd.) によって視覚化した。同様な GFP-融合タンパクの HLE 細胞内での発現レベルは、抗-NS5B IgG 及び抗-GFP-IgG (Clontech Co., Ltd.) を用いて、参考例 1 に記載の方法でウエスタンブロッティングにより、免疫学的に検出した。同様にして、他の変異体 NS5B についても実験した。

結果を図 10 に示す。図中、(A) は全長 NS5B、(B) は GFP-NS5

Bt、(C)はGFP-NS5B-m4、(D)はGFP単独の結果である。

図10から、GFP-NS5Bタンパクは、主として、細胞質核膜周囲に主に分布し、細胞質にも分散したが、GFP単独では、細胞質と核の両方に拡散して局在化することが分かる(図10A)。また、GFP-NS5Btタンパクは核に主に集積し、その局在化がC-末端領域の切断により大きく影響を受けたことが分かる(図10B)。図10において、GFP-NS5Btの蛍光性の核内のシグナルは、大きい球形の不規則な形を持った数個のクラスターとして観察される。

また、NS5BのC末端のアンカー領域の機能を損なうように設計された2つの置換変異を有するGFP-NS5B-m4も核に局在すると共に、一部、細胞質にも認められた(図10C)。同様の結果は他の哺乳動物細胞COS1細胞又はHepG2細胞でも認められた。以上の結果は、NS5BのC末端21個のアミノ酸領域がNS5Bタンパクの細胞下での局在化に重要な役割を果たし、膜上に固定するアンカーの役割を示すものと考えられた。

## 請 求 の 範 囲

1. ヒトC型肝炎ウイルスのRNA依存性RNAポリメラーゼ由来の、ポリメ  
ラーゼ活性を有する可溶型ポリペプチドをコードするDNAと、該ポリペプチド  
5 以外の第2のポリペプチドをコードするDNAとを含む発現ベクターで宿主細胞  
を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、培地から該ポリメラーゼ活性を有  
する融合タンパクを回収し、所望により、該融合タンパクからポリメラーゼ活性  
を有するポリペプチドを分離、回収することからなる、組換え型RNA依存性R  
NAポリメラーゼの製造方法。
- 10 2. 該可溶型ポリペプチドが、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列のアミ  
ノ酸番号1から570までの配列、該配列においてアミノ酸が欠失、置換若しくは  
付加されたアミノ酸配列を有し、かつ上記ポリメラーゼ活性を有するものであ  
る請求項1記載の方法。
- 15 3. 第2のポリペプチドがグルタチオンS-トランスフェラーゼである請求項1  
記載の方法。
4. 請求項1記載の方法で製造された組換え型RNA依存性RNAポリメラーゼ。
5. 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号1から570まで  
の配列、該配列においてアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列  
を有するポリペプチドと、グルタチオンS-トランスフェラーゼとの融合タンパ  
クであって、ヒトC型肝炎ウイルスのRNA依存性RNAポリメラーゼ活性を有  
20 する組換え型タンパク。
6. 請求項5記載のタンパクをコードするDNA。
7. 請求項6記載のDNAを含有する発現ベクター。
8. 請求項7記載の発現ベクターで形質転換された形質転換体。

Fig. 1

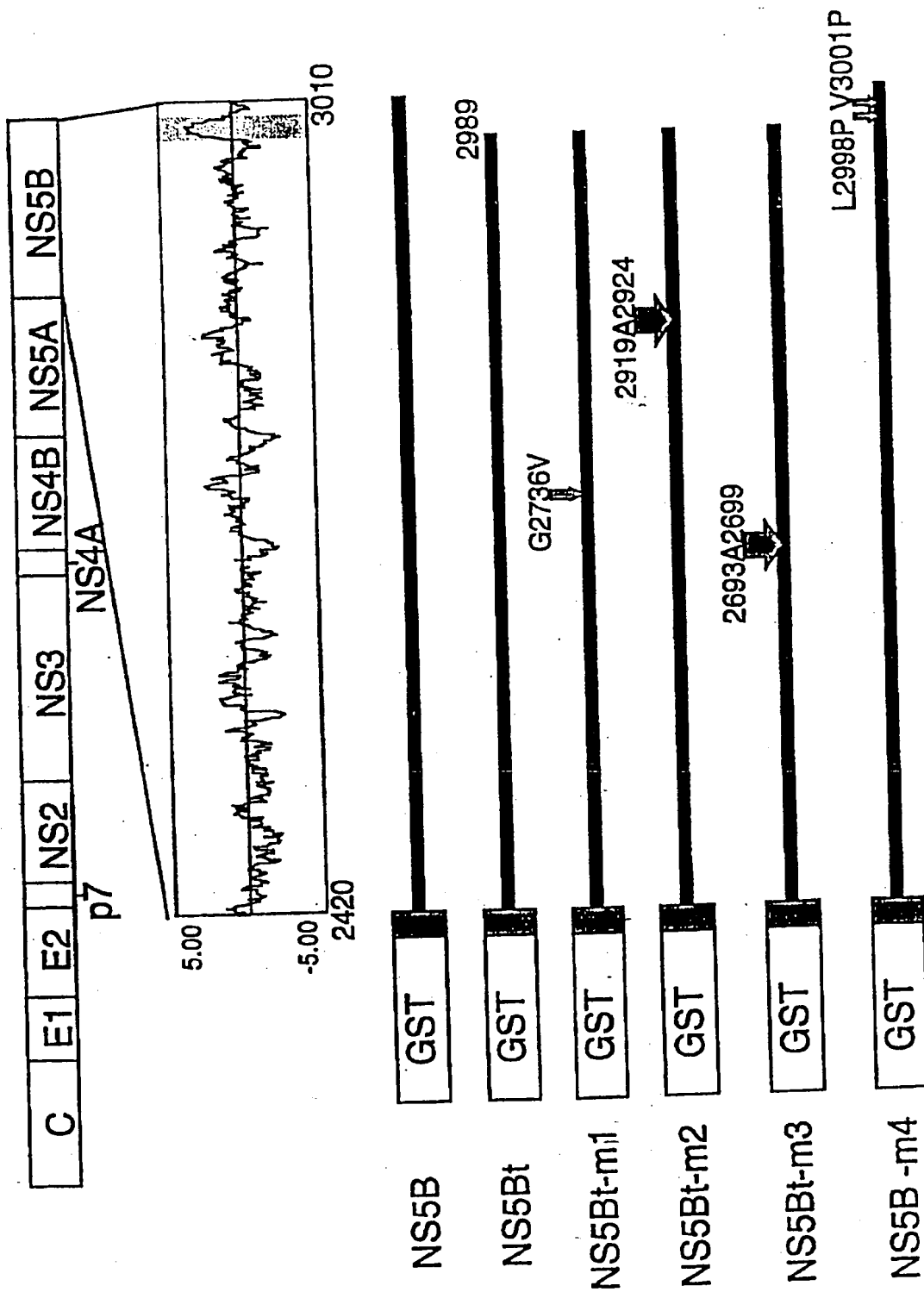




Fig. 2

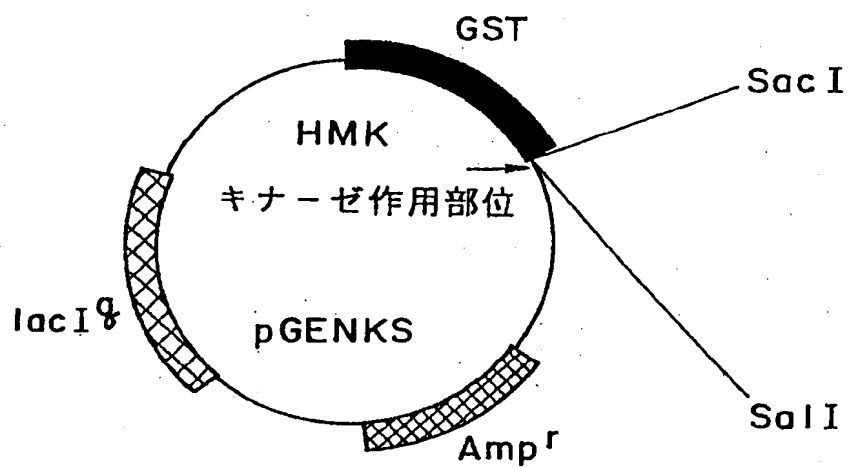


Fig. 3

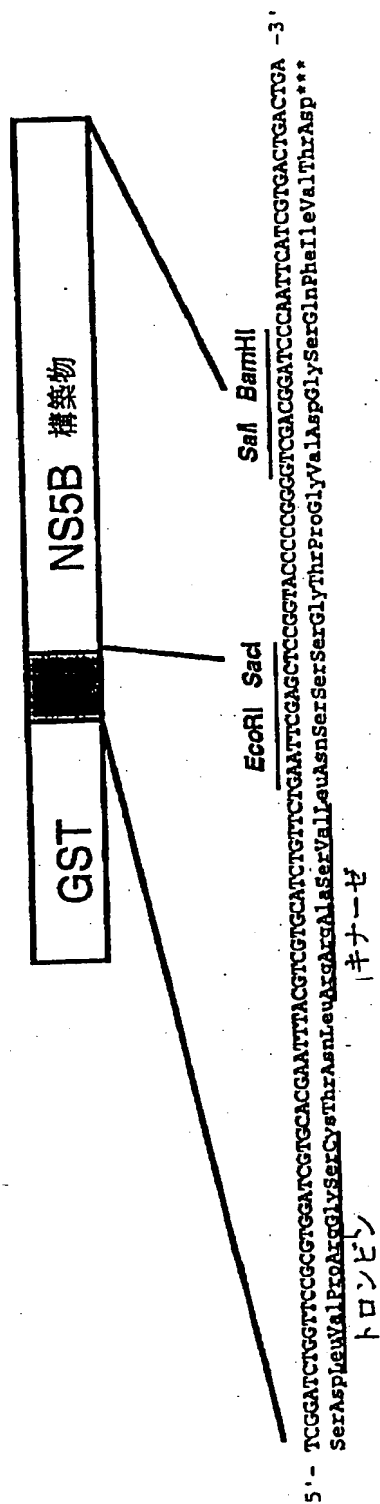


Fig. 4

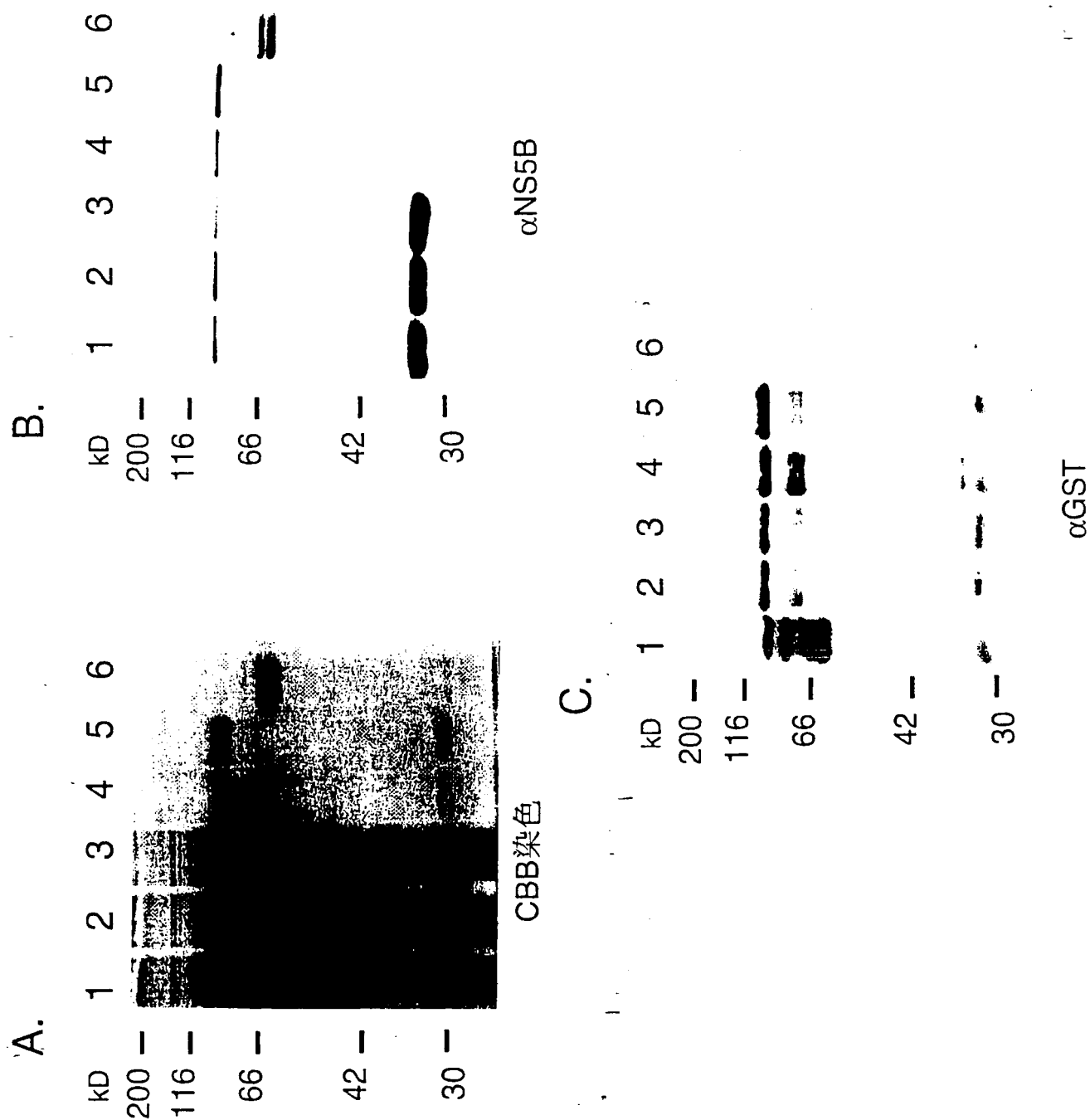


Fig. 5

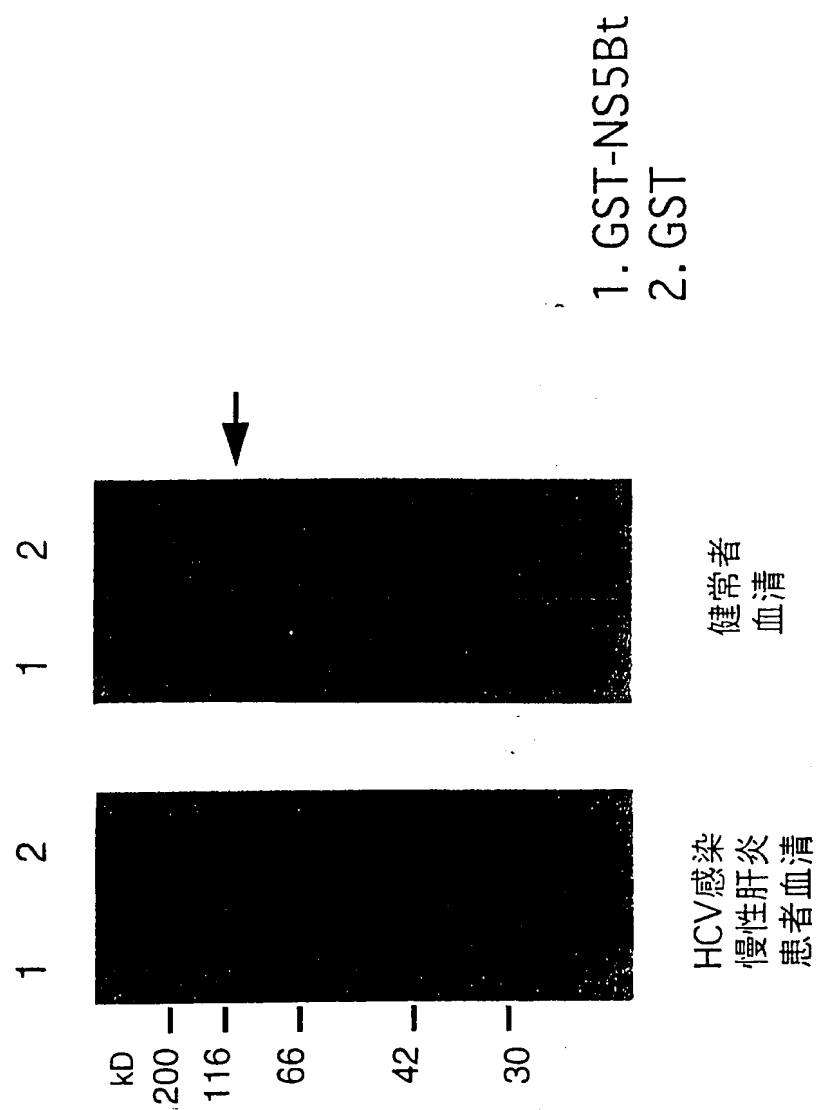


Fig. 6

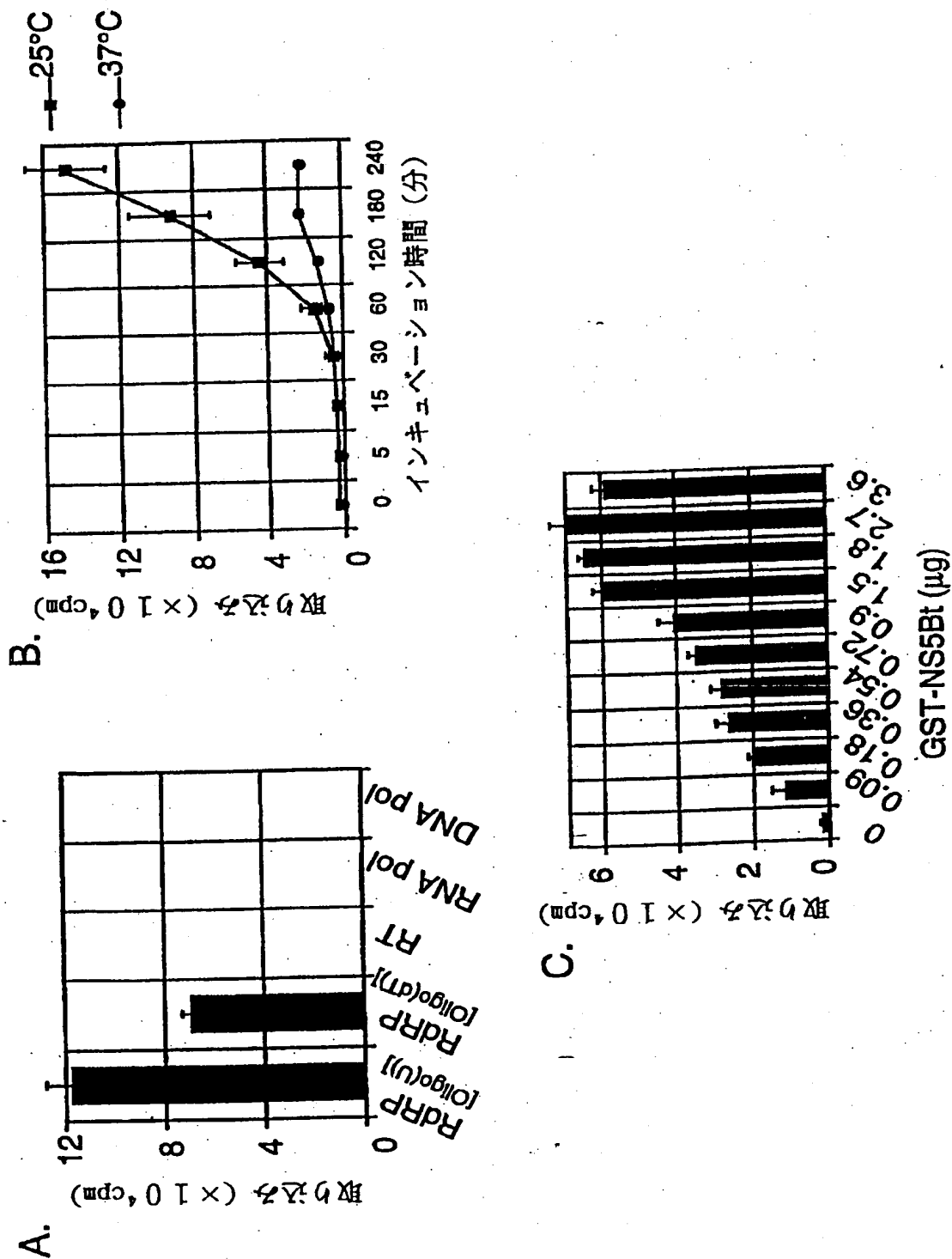


Fig. 7

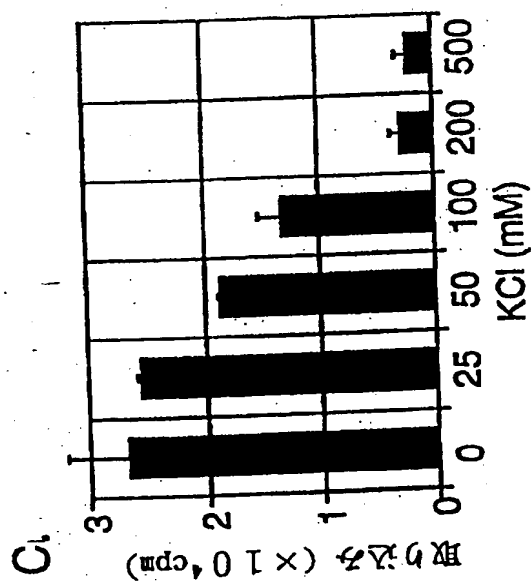
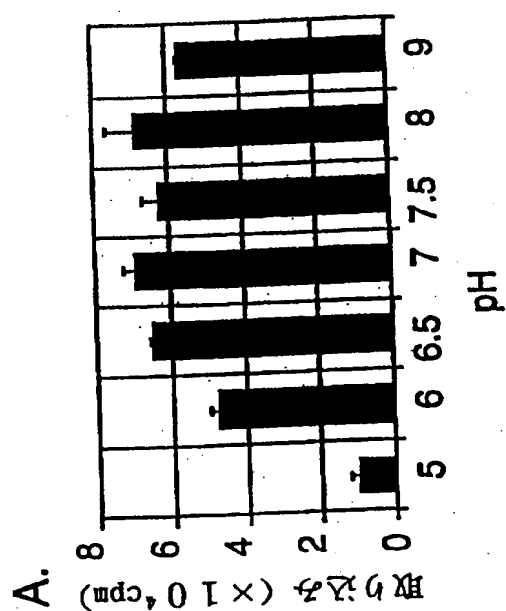
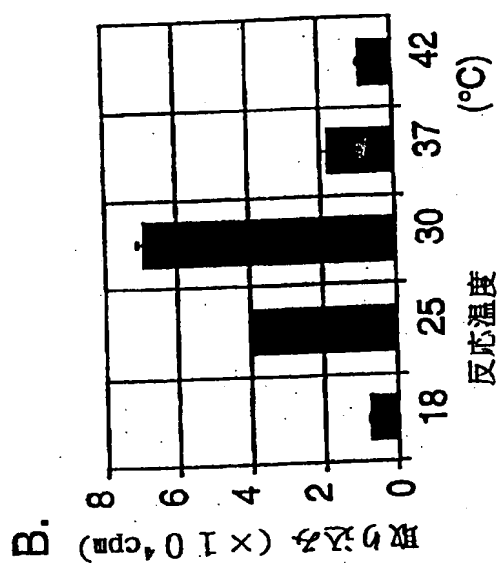


Fig. 8

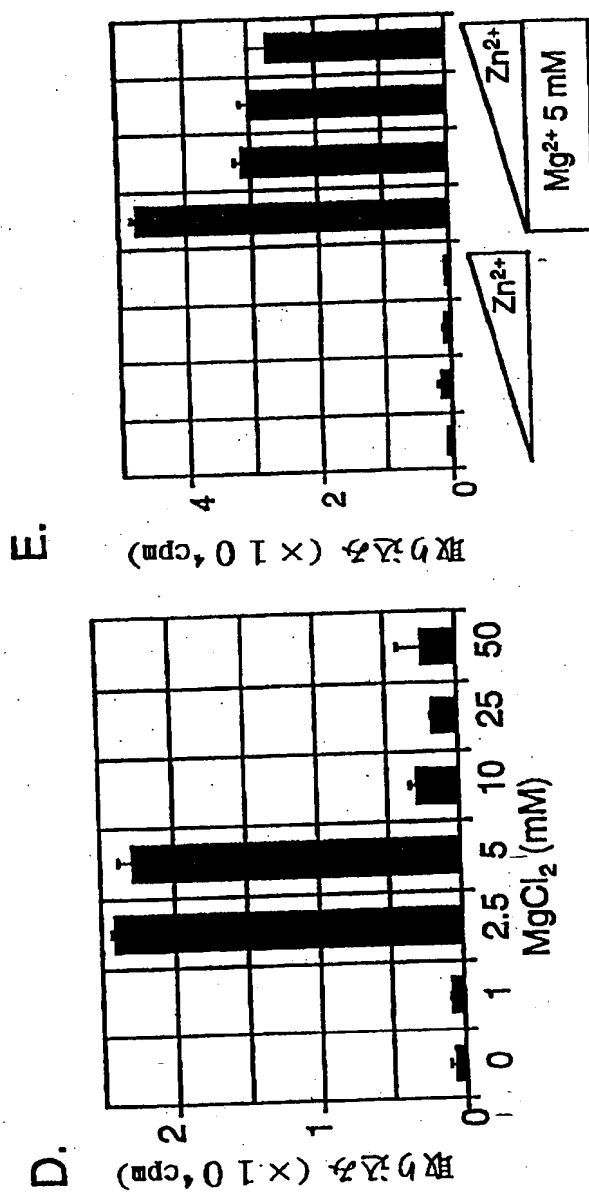
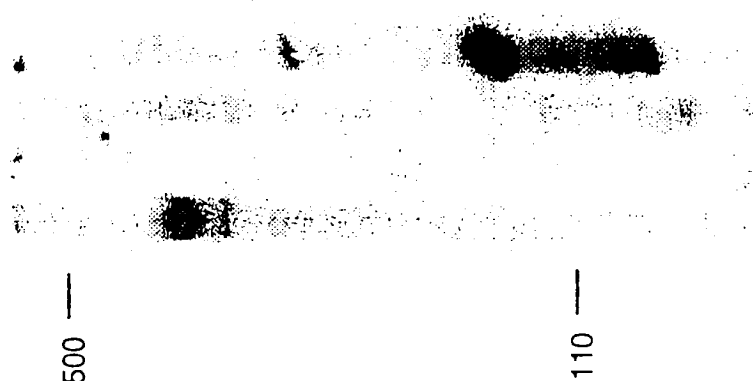
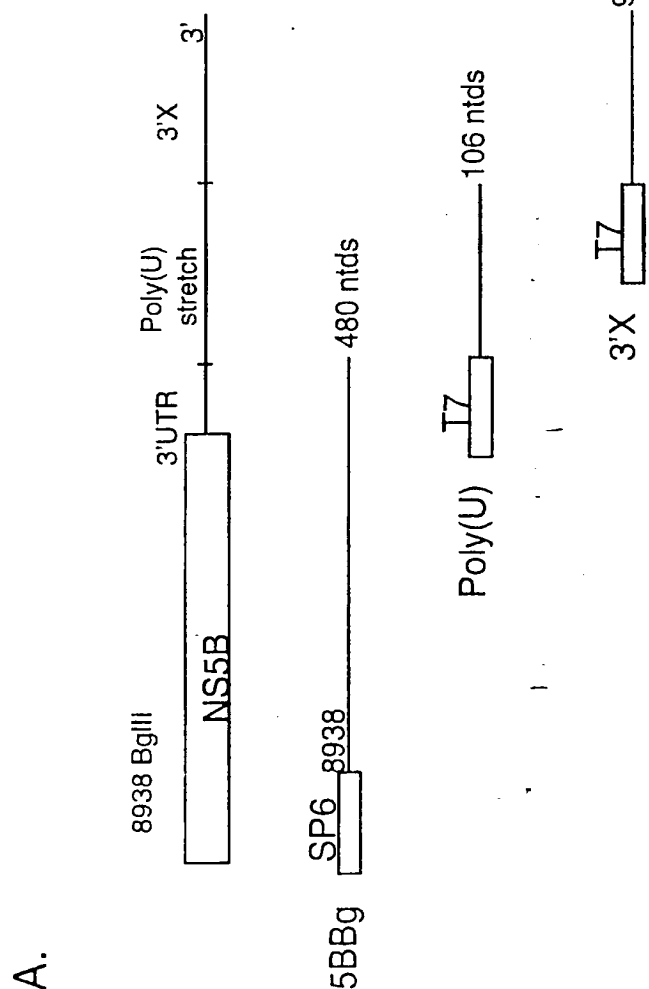


Fig. 9

5BBg  
Poly(U)  
3'X

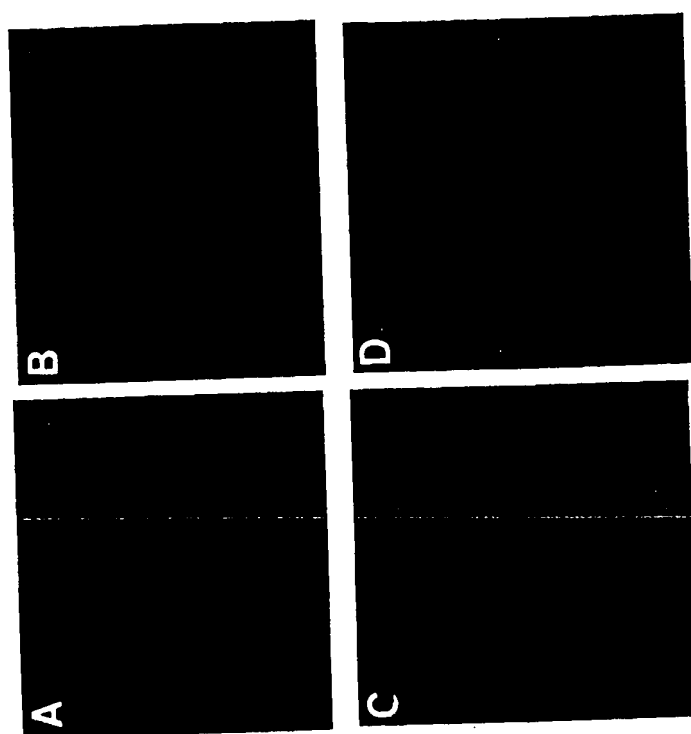
B.  
MM  
(ntds)



8M 尿素 8% PAGE



Fig. 10



## 配列表

## SEQUENCE LISTINGS

&lt;110&gt; イーライ・リリー・アンド・カンパニー

ELI LILLY AND COMPANY

5 <120> ヒトC型肝炎ウイルスのRNA依存性ポリメラーゼ活性を有する組換え型  
タンパク及びその製造方法

&lt;130&gt; 660950

&lt;150&gt; JP 10/047015

&lt;151&gt; 1998-2-27

10 &lt;160&gt; 19

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1733

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Hepatitis C virus JK-1 (NS5B)

15 &lt;400&gt; 1

tcg atg tct tac acg tgg aca ggc gcc cta atc aca cca tgc gcc gcg 48

Ser Met Ser Tyr Thr Trp Thr Gly Ala Leu Ile Thr Pro Cys Ala Ala

1 5 10 15

gag gag agc aag ctg ccc atc aat ccg ttg agc aac tct ttg ctg cgt 96

20 Glu Glu Ser Lys Leu Pro Ile Asn Pro Leu Ser Asn Ser Leu Leu Arg

20 25 30

cac cac aac atg gtc tac gcc aca aca tct cgc agc gca ggc cta cgg 144

His His Asn Met Val Tyr Ala Thr Thr Ser Arg Ser Ala Gly Leu Arg

35 40 45

25 cag aaa aag gtc acc ttt gac aga ctg cag gtc ccg gac gac cat tac 192

Gln Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val Pro Asp Asp His Tyr

50 55 60

|    |   |     |
|----|---|-----|
|    | cgg gac gtg ctc aag gag atg aag gcg aag gcg tcc aca gtt aag gct | 240 |
|    | Arg Asp Val Leu Lys Glu Met Lys Ala Lys Ala Ser Thr Val Lys Ala |     |
|    | 65 70 75 80   |     |
|    | aaa ctt cta tct gta gaa gaa gcc tgc aag ctg acg ccc cca cac tcg | 288 |
| 5  | Lys Leu Leu Ser Val Glu Glu Ala Cys Lys Leu Thr Pro Pro His Ser |     |
|    | 85 90 95  |     |
|    | gcc aga tcc aaa ttt ggc tat ggg gcg aag gac gtc cgg aac cta tcc | 336 |
|    | Ala Arg Ser Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val Arg Asn Leu Ser |     |
|    | 100 105 110   |     |
| 10 | agc aag gcc gtt aac cac atc cac tcc gtg tgg aag gac ttg ctg gaa | 384 |
|    | Ser Lys Ala Val Asn His Ile His Ser Val Trp Lys Asp Leu Leu Glu |     |
|    | 115 120 125   |     |
|    | gac act gaa aca cca att gac act acc atc atg gca aaa aat gag gtc | 432 |
|    | Asp Thr Glu Thr Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn Glu Val |     |
| 15 | 130 135 140   |     |
|    | ttc tgt gtt caa cca gag aaa gga ggc cgc aag cca gcc cgc ctt atc | 480 |
|    | Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Gly Arg Lys Pro Ala Arg Leu Ile |     |
|    | 145 150 155 160   |     |
|    | gta ttc cca gaa ctt ggg gtt cgt gtg tgc gag aaa atg gcc ctt tac | 528 |
| 20 | Val Phe Pro Glu Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala Leu Tyr |     |
|    | 165 170 175   |     |
|    | gac gtg gtc tcc act ctt cct cag gcc gtg atg ggc tcc tca tac gga | 576 |
|    | Asp Val Val Ser Thr Leu Pro Gln Ala Val Met Gly Ser Ser Tyr Gly |     |
|    | 180 185 190   |     |
| 25 | ttc cag tac tct cct ggg cag cgg gtc gag ttc ctg gtg aat gcc tgg | 624 |
|    | Phe Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu Val Asn Ala Trp |     |
|    | 195 200 205   |     |

|    |   |      |
|----|---|------|
|    | aaa tcg aag aaa aac cct atg ggc ttc gca tat tgc acc cgc tgt ttt | 672  |
|    | Lys Ser Lys Lys Asn Pro Met Gly Phe Ala Tyr Cys Thr Arg Cys Phe |      |
|    | 210 215 220   |      |
|    | gac tca acg gtc act gag agt gat atc cgt gtt gag gag tca att tac | 720  |
| 5  | Asp Ser Thr Val Thr Glu Ser Asp Ile Arg Val Glu Glu Ser Ile Tyr |      |
|    | 225 230 235 240   |      |
|    | caa tgt tgt gac ttg gcc ccc gag gcc aga cag gtc ata agg tcg ctc | 768  |
|    | Gln Cys Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Arg Gln Val Ile Arg Ser Leu |      |
|    | 245 250 255   |      |
| 10 | acg gag cgg ctt tat atc ggg ggc ccc ctg act aat tca aaa ggg cag | 816  |
|    | Thr Glu Arg Leu Tyr Ile Gly Gly Pro Leu Thr Asn Ser Lys Gly Gln |      |
|    | 260 265 270   |      |
|    | aac tgc ggt tat cgc cgg tgc cgc gcc agc ggt gtg ctg acg act aac | 864  |
|    | Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val Leu Thr Thr Asn |      |
| 15 | 275 280 285   |      |
|    | tgc ggt aat acc ctc aca tgt tac ttg aag gcc tct gca gcc tgt cga | 912  |
|    | Cys Gly Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Leu Lys Ala Ser Ala Ala Cys Arg |      |
|    | 290 295 300   |      |
|    | gct gca aag ctc cag gac tgc acg atg ctc gtg tgc gga gac gac ctt | 960  |
| 20 | Ala Ala Lys Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Cys Gly Asp Asp Leu |      |
|    | 305 310 315 320   |      |
|    | gtc gtt atc tgt gaa agc gcg gga acc cag gag gac gcg gcg agc cta | 1008 |
|    | Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Thr Gln Glu Asp Ala Ala Ser Leu |      |
|    | 325 330 335   |      |
| 25 | cga gtc ttc acg gag gct atg act agg tac tct gcc ccc ccc ggg gac | 1056 |
|    | Arg Val Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly Asp |      |
|    | 340 335 350   |      |

|    |   |      |
|----|---|------|
|    | ccg ccc caa cca gaa tac gac ttg gag tta ata aca tca tgc tcc tcc | 1104 |
|    | Pro Pro Gln Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys Ser Ser |      |
|    | 355 360 365   |      |
| 5  | aac gtg tgc gtc gcg cac gac gca tct ggc aag cgg gtg tac tac ctc | 1152 |
|    | Asn Val Ser Val Ala His Asp Ala Ser Gly Lys Arg Val Tyr Tyr Leu |      |
|    | 370 375 380   |      |
|    | act cgc gac ccc acc acc ccc ctc gcg agg gca gcg tgg gaa aca gca | 1200 |
|    | Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu Thr Ala |      |
|    | 385 390 395 400   |      |
| 10 | aga cac act cca gta aac tcc tgg cta ggc aac atc atc atg tac gcg | 1248 |
|    | Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Met Tyr Ala |      |
|    | 405 410 415   |      |
|    | ccc acc ctg tgg gca agg atg att ctg atg acc cac ttc ttc tcc atc | 1296 |
|    | Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His Phe Phe Ser Ile |      |
| 15 | 420 425 430   |      |
|    | ctt cta gct cag gag caa ctt gaa aaa gcc ctg ggt tgt cag atc tac | 1344 |
|    | Leu Leu Ala Gln Glu Gln Leu Glu Lys Ala Leu Gly Cys Gln Ile Tyr |      |
|    | 435 440 445   |      |
|    | ggg gcc act tac ttc att gaa cca ctt gac cta cct cag atc att cag | 1392 |
| 20 | Gly Ala Thr Tyr Phe Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Gln Ile Ile Gln |      |
|    | 450 455 460   |      |
|    | cga ctc cac ggt ctt agc gca ttt tca ctc cac agt tac tct cca ggt | 1440 |
|    | Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr Ser Pro Gly |      |
|    | 465 470 475 480   |      |
| 25 | gaa atc aat agg gtg gct tca tgc ctc agg aaa ctt ggg gta cca ccc | 1488 |
|    | Glu Ile Asn Arg Val Ala Ser Cys Leu Arg Lys Leu Gly Val Pro Pro |      |
|    | 485 490 495   |      |

5      1536  
 ttg cga gtc tgg aga cat cgg gcc aga agt gtc cgc gct aag cta ctg  
 Leu Arg Val Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg Ala Lys Leu Leu  
             500                      505                      510  
 5      1584  
 tcc cag ggg ggg agg gcc gcc act tgt ggc aag tac ctc ttc aac tgg  
 Ser Gln Gly Gly Arg Ala Ala Thr Cys Gly Lys Tyr Leu Phe Asn Trp  
             515                      520                      525  
 gca gtg agg acc aag ctt aaa ctc act cca att ccg gct gcg tcc cag      1632  
 Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Pro Ala Ala Ser Gln  
             530                      535                      540  
 10      1680  
 ttg gac tta tcc ggc tgg ttc gtt gct ggt tac agc ggg gga gac ata  
 Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Val Ala Gly Tyr Ser Gly Gly Asp Ile  
 545                      550                      555                      560  
 tat cac agc ctg tct cgt gcc cga ccc cgc tgg ttc atg tgg tgc cta      1728  
 Tyr His Ser Leu Ser Arg Ala Arg Pro Arg Trp Phe Met Trp Cys Leu  
 15                      565                      570                      575  
 ctc cta ctt tct gta ggg gta ggc atc tac ctg ctc ccc aac cgg      1773  
 Leu Leu Leu Ser Val Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu Pro Asn Arg  
             580                      585                      590  
 <210> 2  
 20      <211> 591  
             <212> PRT  
             <213> Hepatitis C virus JK-1 (NS5B)  
             <400> 2  
 Ser Met Ser Tyr Thr Trp Thr Gly Ala Leu Ile Thr Pro Cys Ala Ala  
 25      1                      5                      10                      15  
 Glu Glu Ser Lys Leu Pro Ile Asn Pro Leu Ser Asn Ser Leu Leu Arg  
             20                      25                      30

His His Asn Met Val Tyr Ala Thr Thr Ser Arg Ser Ala Gly Leu Arg  
 35 40 45  
 Gln Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val Pro Asp Asp His Tyr  
 50 55 60  
 5 Arg Asp Val Leu Lys Glu Met Lys Ala Lys Ala Ser Thr Val Lys Ala  
 65 70 75 80  
 Lys Leu Leu Ser Val Glu Glu Ala Cys Lys Leu Thr Pro Pro His Ser  
 85 90 95  
 Ala Arg Ser Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val Arg Asn Leu Ser  
 10 100 105 110  
 Ser Lys Ala Val Asn His Ile His Ser Val Trp Lys Asp Leu Leu Glu  
 115 120 125  
 Asp Thr Glu Thr Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn Glu Val  
 130 135 140  
 15 Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Gly Arg Lys Pro Ala Arg Leu Ile  
 145 150 155 160  
 Val Phe Pro Glu Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala Leu Tyr  
 165 170 - 175  
 Asp Val Val Ser Thr Leu Pro Gln Ala Val Met Gly Ser Ser Tyr Gly  
 20 180 185 190  
 Phe Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu Val Asn Ala Trp  
 195 200 205  
 Lys Ser Lys Lys Asn Pro Met Gly Phe Ala Tyr Cys Thr Arg Cys Phe  
 210 215 220  
 25 Asp Ser Thr Val Thr Glu Ser Asp Ile Arg Val Glu Glu Ser Ile Tyr  
 225 230 235 240  
 Gln Cys Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Arg Gln Val Ile Arg Ser Leu

|    |   |     |     |
|----|---|-----|-----|
|    | 245   | 250 | 255 |
|    | Thr Glu Arg Leu Tyr Ile Gly Gly Pro Leu Thr Asn Ser Lys Gly Gln |     |     |
|    | 260   | 265 | 270 |
|    | Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val Leu Thr Thr Asn |     |     |
| 5  | 275   | 280 | 285 |
|    | Cys Gly Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Leu Lys Ala Ser Ala Ala Cys Arg |     |     |
|    | 290   | 295 | 300 |
|    | Ala Ala Lys Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Cys Gly Asp Asp Leu |     |     |
|    | 305   | 310 | 315 |
| 10 | Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Thr Gln Glu Asp Ala Ala Ser Leu |     |     |
|    | 325   | 330 | 335 |
|    | Arg Val Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly Asp |     |     |
|    | 340   | 335 | 350 |
|    | Pro Pro Gln Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys Ser Ser |     |     |
| 15 | 355   | 360 | 365 |
|    | Asn Val Ser Val Ala His Asp Ala Ser Gly Lys Arg Val Tyr Tyr Leu |     |     |
|    | 370   | 375 | 380 |
|    | Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu Thr Ala |     |     |
|    | 385   | 390 | 395 |
| 20 | Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Met Tyr Ala |     |     |
|    | 405   | 410 | 415 |
|    | Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His Phe Phe Ser Ile |     |     |
|    | 420   | 425 | 430 |
|    | Leu Leu Ala Gln Glu Gln Leu Glu Lys Ala Leu Gly Cys Gln Ile Tyr |     |     |
| 25 | 435   | 440 | 445 |
|    | Gly Ala Thr Tyr Phe Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Gln Ile Ile Gln |     |     |
|    | 450   | 455 | 460 |



Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr Ser Pro Gly  
 465 470 475 480  
 Glu Ile Asn Arg Val Ala Ser Cys Leu Arg Lys Leu Gly Val Pro Pro  
 485 490 495  
 5 Leu Arg Val Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg Ala Lys Leu Leu  
 500 505 510  
 Ser Gln Gly Gly Arg Ala Ala Thr Cys Gly Lys Tyr Leu Phe Asn Trp  
 515 520 525  
 Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Pro Ala Ala Ser Gln  
 10 530 535 540  
 Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Val Ala Gly Tyr Ser Gly Gly Asp Ile  
 545 550 555 560  
 Tyr His Ser Leu Ser Arg Ala Arg Pro Arg Trp Phe Met Trp Cys Leu  
 565 570 575  
 15 Leu Leu Leu Ser Val Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu Pro Asn Arg  
 580 585 590  
 <210> 3  
 <211> 111  
 <212> DNA  
 20 <213> Artificial Sequence  
 <400> 3  
  
 tcg gat ctg gtt ccg cgt gga tgc tgc acg aat tta cgt cgt gca tct 48  
 Ser Asp Leu Val Pro Arg Gly Ser Cys Thr Asn Leu Arg Arg Ala Ser  
 25 1 5 10 15  
 gtt ctg aat tgc agc tcc ggt acc ccc ggg gtc gac gga tcc caa ttc 96  
 Val Leu Asn Ser Ser Ser Gly Thr Pro Gly Val Asp Gly Ser Gln Phe

20 25 30 111  
atc gtg act gac tga  
Ile Val Thr Asp ...  
35  
5  
<210> 4  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
10 <400> 4  
gaattcgagc tccggtaccc ccggggtcga cggatcc 37  
<210> 5  
<211> 37  
<212> DNA  
15 <213> Artificial Sequence  
<400> 5  
ggatccgtcg accccggggg taccggagct cgaattc 37  
<210> 6  
<211> 33  
20 <212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 6  
gggagctcca tgtcgatgtc ttacacgtgg aca 33  
<210> 7  
25 <211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<400> 7  
gggtcgaccc ggttggggag caggtagatg cc 32  
<210> 8  
<211> 32  
5 <212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 8  
gggtcgacgc ggggtcgggc acgagacagg ct 32  
<210> 9  
10 <211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 9  
gcggatccag atctacgggg ccactta 27  
15 <210> 10  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 10  
20 gcgaattcaa gacaaaggga atggcctat 29  
<210> 11  
<211> 82  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
25 <400> 11  
gcgaattcga agacttccct ttttttttgt tttttttttt ttcttttttt ttttttcttt 60  
tttttccttt tttttttttt ct 82

<210> 12

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5 <400> 12

gcg gatccga agacgccacc aaagaaggaa aagggaaaaa aaaaaaacaagaagaaaaaa 60

aaaaaaaaagg aaaaaaaaaaga 80

<210> 13

<211> 80

10 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

gcgaattcga agacttggtg gctccatctt agccctagtc acggetagct gtgaaaggtc 60

cgtgagccgc atgactgcag 80

15 <210> 14

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

20 gcggatccct taagacatga tctgcagaga ggccagtatc agcactctct gcagtcatgc 60

ggctcac 67

<210> 15

<211> 67

<212> DNA

25 <213> Artificial Sequence

<400> 16

gcggatcctc accggttggg gagcaggtag atgcctaccc cggagaaggt aggagtaggc 60

|    |                                       |    |
|----|---------------------------------------|----|
|    | accacat                               | 67 |
|    | <210> 16                              |    |
|    | <211> 34                              |    |
|    | <212> DNA                             |    |
| 5  | <213> Artificial Sequence             |    |
|    | <400> 16                              |    |
|    | aagatatcgc ggccgcatgg tgagcaaggg cgag | 34 |
|    | <210> 17                              |    |
|    | <211> 31                              |    |
| 10 | <212> DNA                             |    |
|    | <213> Artificial Sequence             |    |
|    | <400> 17                              |    |
|    | aaggatccga attcttgtag agctcgtecca t   | 31 |
|    | <210> 18                              |    |
| 15 | <211> 32                              |    |
|    | <212> DNA                             |    |
|    | <213> Artificial Sequence             |    |
|    | <400> 18                              |    |
|    | atgcggccgc caccatggac tacaagacg at    | 32 |
| 20 | <210> 19                              |    |
|    | <211> 30                              |    |
|    | <212> DNA                             |    |
|    | <213> Artificial Sequence             |    |
|    | <400> 19                              |    |
| 25 | cgggatcctc agtctgagtc aggcccttct      | 30 |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04204

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N9/12, C12N15/51, C12N1/21 // (C12N9/12, C12R1:19),  
(C12N15/51, C12R1:01), (C12N1/21, C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N9/12, C12N15/51, C12N1/21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X/<br>Y   | VOLKER LOHMANN et al., "Biochemical Properties of Hepatitis C Virus NS5B RNA-Dependent RNA Polymerase and Identification of Amino Acid Sequence Motifs Essential for Enzymatic Activity" JOURNAL OF VIROLOGY. (1997) Vol. 71, No. 11, p.8416-8428 | 1-2, 4/<br>1-8        |
| Y         | JP, 9-299079, A (Japan Energy Corp.),<br>25 November, 1997 (25. 11. 97) (Family: none)  | 1-8                   |
| Y         | WO, 9528243, A1 (Pharmacia and Upjohn Co.),<br>16 December, 1997 (16. 12. 97)<br>& JP, 9-512426, A  | 1-8                   |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

|   |  |
|---|--|
| * Special categories of cited documents:  | "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone   |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date  | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family  |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  |  |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  |  |

|   |  |
|---|--|
| Date of the actual completion of the international search<br>11 December, 1998 (11. 12. 98) | Date of mailing of the international search report<br>22 December, 1998 (22. 12. 98) |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Japanese Patent Office                              | Authorized officer   |
| Facsimile No.   | Telephone No.  |

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/04204

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>o</sup> C12N9/12, C12N15/51, C12N1/21// (C12N9/12, C12R1:19), (C12N15/51, C12R1:01), (C12N1/21, C12R1:19)

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>o</sup> C12N9/12, C12N15/51, C12N1/21

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Swiss Prot/PIR/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X/<br>Y         | VOLKER LOHMANN et al. "Biochemical Properties of Hepatitis C Virus NS5B RNA-Dependent RNA Polymerase and Identification of Amino Acid Sequence Motifs Essential for Enzymatic Activity" JOURNAL OF VIROLOGY. (1997) Vol. 71, No. 11, p. 8416-8428 | 1-2, 4/<br>1-8   |
| Y               | J P, 9-299079, A (株式会社ジャパンエナジー) 25. 11月. 1997 (25. 11. 97) (ファミリーなし)  | 1-8              |
| Y               | WO, 9528243, A1 (ファルマシア・アント・アップ・ジョン・カンパニー) 16. 12月. 1997 (16. 12. 97) & J P, 9-512426, A  | 1-8              |

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 12. 98

国際調査報告の発送日

22.12.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4 B

9637

電話番号 03-3581-1101 内線

3449